



Pradera de angiospermas marinas en el mar Mediterráneo, Turquía (Foto: Levend Gokce)

**Efecto de la frecuencia de alimentación en el cultivo
de doradas y su consecuencia en comunidades
dominadas por angiospermas marinas**

TRABAJO FIN DE GRADO

DICIEMBRE 2018

DAVID SÁNCHEZ RUIZ

D. Juan Miguel Mancera Romero, Doctor en Biología y Catedrático de la Universidad de Cádiz del Departamento de Biología, de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz, y D. Luis Gonzalo Egea Tinoco, Doctor en Ecología e investigador postdoctoral en el grupo de investigación Estructura y Dinámica de Ecosistemas Acuáticos (EDEA, Departamento de Biología, área de Ecología) de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz.

HACEN CONSTAR,

Que la memoria recogida en este Trabajo Fin de Grado, titulado: **“Efecto de la frecuencia de alimentación en el cultivo de doradas y su consecuencia en comunidades dominadas por angiospermas marinas”** presentado por “David Sánchez Ruiz”, ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que resume su trabajo de investigación y que reúne todos los requisitos legales, autorizan su presentación y defensa para la obtención del doble Grado PCEO Ciencias Ambientales - Ciencias del Mar por la Universidad de Cádiz.

En Puerto Real, 30 de noviembre de 2018



Fdo: Juan Miguel Mancera Romero

Fdo: Luis G. Egea Tinoco



El presente trabajo de fin grado se ha realizado en el seno del grupo de investigación de "Fisiología y Patología en Acuicultura" del Departamento de Biología de la Universidad de Cádiz y del grupo de investigación EDEA (Estructura y Dinámica de Ecosistemas Acuáticos) del Área de Ecología, del Departamento de Biología de la Universidad de Cádiz, dentro del Proyecto del Plan Nacional de I+D+i PAVAROTTI (CTM2017-85365-R)



AGRADECIMIENTOS

Tras casi un año dedicado a la realización de este trabajo de fin de grado, puedo decir que mereció absolutamente todo la pena. Merecieron las horas interminables leyendo bibliografía, madrugar para criar y alimentar a mis “pezqueñines”, pasar una noche en vela para recoger las muestras de agua (hay pruebas), la repetición de mediciones en el laboratorio, las peleas continuas con el programa estadístico, etc. Pero también mereció absolutamente la pena conocer y trabajar con todo el equipo del SCI-CM (y asociados), el aprendizaje de multitud de cosas nuevas y lo más importante, descubrir lo satisfactorio que es ver este trabajo terminado....

En primer lugar, agradecer a mis tutores el Dr. Juan Miguel Mancera Romero y el Dr. Luis Gonzalo Egea Tinoco su paciencia, supervisión y apoyo en la realización de esta memoria.

A continuación, quiero agradecer a todos aquellas personas de mi Facultad ya sean alumnos de FP de acuicultura, grado, máster, doctorando, investigadores postdoctorales, etc, que sin tener que hacerlo, me han ofrecido su mano para ayudarme en mi trabajo. Primero, me gustaría agradecerle a Mercedes Hidalgo, alumna del “Zaporito”, su gran ayuda con el mantenimiento del experimento en el peor momento, cuando comencé a llevar a la vez ambas partes (Tanques de Peces + Acuarios de plantas). Segundo, no puedo olvidarme de Roció Jiménez, que sin su ayuda con la identificación de la fauna aún estaría liado con los “bichitos”. Tercero, mencionar a Andre Barany, que, sin ser su experimento, tuvo paciencia conmigo y me enseñó y ayudó en el laboratorio. Y qué decir de Emilio Rivelott y Rubén Rios, compañeros del grado que tras tantas tazas de café (y cosas más fuertes) escuchándome como me quejaba, merecen estar aquí. GRACIAS A TODOS (también a los que me he olvidado...)

Por último, me gustaría dedicarle un pequeño párrafo a mi familia. Comenzar hablando de mis dos hermanos, que deberían estar orgullosos de mí, porque la “oveja negra” de la familia va a terminar la carrera. Aunque no os lo digo muy a menudo, gracias por estar siempre ahí. Ahora os toca a ustedes: Papá, te pido disculpas por las innumerables veces que estando con el trabajo te he contestado mal, gracias por aguantarme. Mamá, también debería pedirte disculpas. He tenido el cuarto casi un año como una “pocilga”, te prometo que lo recogeré pronto.... Gracias por ayudarme en todo lo que podéis y en lo que no podéis.

Para terminar, tengo que acordarme de ti, mi compañera de viaje. Eres la persona que más me ha apoyado y la que más me ha sufrido. Has estado siempre ahí, con tu paciencia y tus consejos. Gracias por ayudarme a desconectar, gracias de verdad, de corazón.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA EN LA ECONOMÍA ACTUAL	3
1.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA DORADA	4
1.3. LA IMPORTANCIA DE LA FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN EN LA ACUICULTURA, Y CONCRETAMENTE EN EL CULTIVO DE DORADAS	6
1.4. IMPACTOS DE LA ACUICULTURA EN EL MEDIO AMBIENTE	7
1.5. IMPORTANCIA DE LOS ECOSISTEMAS COSTEROS: LAS ANGIOSPERMAS MARINAS	8
1.6. IMPACTOS DE LA ACTIVIDAD ACUÍCOLA EN LAS PRADERAS DE ANGIOSPERMAS MARINAS	10
1.7. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
2. MATERIAL Y MÉTODOS	12
2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	12
2.1.1. CULTIVO DE PECES CON DIFERENTE FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN	12
2.1.2. CULTIVO DE PRADERAS DE ANGIOSPERMAS MARINAS CON AGUA PROCEDENTE DEL CULTIVO DE PECES	14
2.2. RECOLECCIÓN DE PECES Y COMUNIDADES DE ANGIOSPERMAS MARINA	16
2.3. ANÁLISIS EN LABORATORIO	18
2.3.1. MUESTRAS PROCEDENTES DEL CULTIVO DE PECES CON DIFERENTE FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN	18
2.3.2. MATERIA ORGÁNICA Y NUTRIENTES	21
2.3.3. ANGIOSPERMAS MARINAS	22
2.4. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICO	25
3. RESULTADOS	26
3.1. CULTIVO DE PECES CON DIFERENTE FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN	26
3.1.1. PARÁMETROS BIOMÉTRICOS Y NUTRICIONALES	26

3.1.2. PARÁMETROS PLASMÁTICOS	27
3.1.3. PARÁMETROS HEPÁTICOS	28
3.2. ANÁLISIS DEL AGUA	29
3.2.1. CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES Y <i>MO</i> EN LOS TANQUES DE DORADA A LO LARGO DEL DÍA	29
3.2.2. CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES Y <i>MO</i> A LA SALIDA DE LOS TANQUES DE DORADA Y EN LOS ACUARIOS DE COMUNIDADES DE ANGIOSPERMAS MARINAS	30
3.3. CULTIVO DE PRADERAS DE ANGIOSPERMAS MARINAS CON AGUA PROCEDENTE DEL CULTIVO DE PECES	35
3.3.1. MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO DE PLANTAS	35
3.3.2. PÉRDIDA DE HOJAS Y HACES	38
3.3.3. ANÁLISIS DEL ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS PLANTAS	38
3.3.4. BIODIVERSIDAD DE LA COMUNIDAD	39
<u>4. DISCUSIÓN</u>	<u>42</u>
4.1. CULTIVO DE PECES CON DIFERENTE FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN	42
4.2. EFECTOS DEL AGUA PROCEDENTE DEL CULTIVO DE PECES EN COMUNIDADES FORMADAS POR PRADERAS DE ANGIOSPERMAS MARINAS	44
<u>5. CONCLUSIONES</u>	<u>47</u>
<u>6. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>48</u>

RESUMEN

La acuicultura es una actividad económica cada vez más importante que debe avanzar, mediante mejoras en las técnicas de cultivo y reduciendo su impacto medioambiental, hacia un desarrollo sostenible. La frecuencia de alimentación es un factor clave para optimizar el cultivo; sin embargo, su efecto sobre el cultivo de la dorada (*Sparus aurata*) y su consecuencia en los ecosistemas naturales han sido poco evaluados. El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado ha sido analizar cómo la frecuencia de alimentación en la dorada puede alterar tanto el crecimiento y metabolismo de los peces como la cantidad de residuos producidos y su efecto sobre las comunidades dominadas por la angiosperma marina *Zostera noltei*. Para ello, se alimentaron ejemplares de doradas al 2% del peso húmedo durante 79 días con 3 diferentes frecuencias de alimentación: i) una dosis (2% del peso); ii) dos dosis (1% del peso); y iii) tres dosis (0,67% del peso). Además, el efluente de las dos frecuencias de alimentación más extremas se utilizó para el cultivo en mesocosmos de comunidades dominadas por *Z. noltei* durante 4 semanas. Los resultados mostraron variaciones en diversos parámetros plasmáticos y hepáticos de *S. aurata*. La frecuencia de alimentación de tres dosis diarias permitió un suministro constante de energía, produciendo valores superiores de glucemia respecto a los de una dosis diaria. En cambio, la frecuencia de alimentación de una dosis diaria produjo una mayor movilización de las reservas lipídicas. En el agua efluente de los cultivos se disminuyó la concentración de la mayoría de los nutrientes (amonio, nitrito y fosfato) al incrementar la frecuencia de alimentación. Esta agua efluente perjudicó a las comunidades de *Z. noltei* tanto a nivel fisiológico (afectando al crecimiento, metabolismo y mortalidad) como a nivel de comunidad (disminuyendo la biodiversidad). Sin embargo, los resultados mostraron que la comunidad sometida al agua procedente del cultivo con una dosis diaria presentó un menor porcentaje de haces apicales, mayor mortalidad, menor concentración de almidón y una mayor disminución de biodiversidad. En conclusión, se ha comprobado cómo una frecuencia de alimentación de tres dosis diarias produce mejores condiciones metabólicas en los ejemplares de *S. aurata*, optimizando su crecimiento, disminuyendo la cantidad de nutrientes en el vertido y atenuando posibles efectos negativos sobre los ecosistemas adyacentes, tales como praderas de angiospermas marinas.

ABSTRACT

Aquaculture is an increasingly important economic activity that must be developed sustainably, through improvements in cultivation techniques and the reduction of its environmental impacts. The feeding frequency is a key factor to optimize the production, however, its effect on the raising of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and its consequences in natural ecosystems has not been properly evaluated. The objective of this end-of-degree project was to analyze how the feeding frequency in the gilthead seabream can alter both the growth and metabolism of the fish, as well as the amount of waste produced and its effect on the seagrass communities dominated by *Zostera noltei*. Then, specimens of gilthead seabream were fed to 2% of the wet weight during 79 days with three different feeding frequencies: i) one dose (2% of the weight); ii) two doses (1% of the weight); and iii) three doses (0.67% of the weight). In addition, the effluent water of the two most extreme feeding frequencies was transferred to the communities dominated by *Z. noltei* in mesocosms during four weeks. The results showed variations in various plasmatic and hepatic parameters of *S. aurata*. The feeding frequency of three daily doses enabled a constant energy supply, producing higher blood glucose levels in comparison to the three daily dose treatment. In contrast, a feeding frequency of a daily dose produced a greater mobilization of the lipid reserves. Moreover, as the feeding frequency increased the nutrient concentrations (ammonium, nitrite and phosphate) decreased. Thus, the increase in the concentration of nutrients affected negatively to *Z. noltei* communities, both at physiological level (i.e. influencing the growth, metabolism and mortality) and community level (i.e. decreasing the biodiversity). Thus, the seagrass community under a feeding frequency of a daily dose showed a lower percentage of apical shoots, higher mortality, lower starch concentration and a decrease in biodiversity. In conclusion, this study has demonstrated how a feeding frequency of three daily doses results in better metabolic conditions for the specimens of *S. aurata*, thereby, optimizing its growth, reducing the amount of nutrients wasted in the effluent water, and ameliorating negative effects on adjacent ecosystems, such as seagrasses.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de la acuicultura en la economía actual

La actividad pesquera ha sido fundamental en la economía y en el desarrollo de la población humana a lo largo de la historia. Esta actividad ha formado parte importante de la economía productiva de las poblaciones costeras al menos desde el Neolítico, como se atestigua en el yacimiento del poblado de El Retamar en Puerto Real, de hace 7000 años (Ruiz et al., 2006). Desde entonces la pesca ha sido una actividad sostenible hasta que en el último siglo la gran demanda de pescado, consecuencia del crecimiento exponencial de la población, ha llevado a los caladeros al límite. La sobreexplotación de los caladeros y el aumento de la demanda de pescado hizo que surgiera la acuicultura como forma de aliviar la presión de los caladeros naturales y satisfacer la creciente demanda.

La gran demanda asociada al crecimiento demográfico ha hecho aumentar la producción mundial (pesca de captura y acuicultura) en los últimos 50 años de manera exponencial. Un buen indicador de la creciente demanda es el consumo aparente de pescado *per capita*, que es una buena estimación del consumo de pescado basado en información recopilada sobre las compras de pescado por hogares (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 2014). Este consumo *per capita* se ha visto incrementado de 9 kg en la década de los 60, a 20,2 kg en 2015. Los nuevos datos de 2016 y 2017 apuntan a un nuevo aumento hasta alcanzar los 20,3 y 20,5 kg *per capita* respectivamente (FAO, 2018).

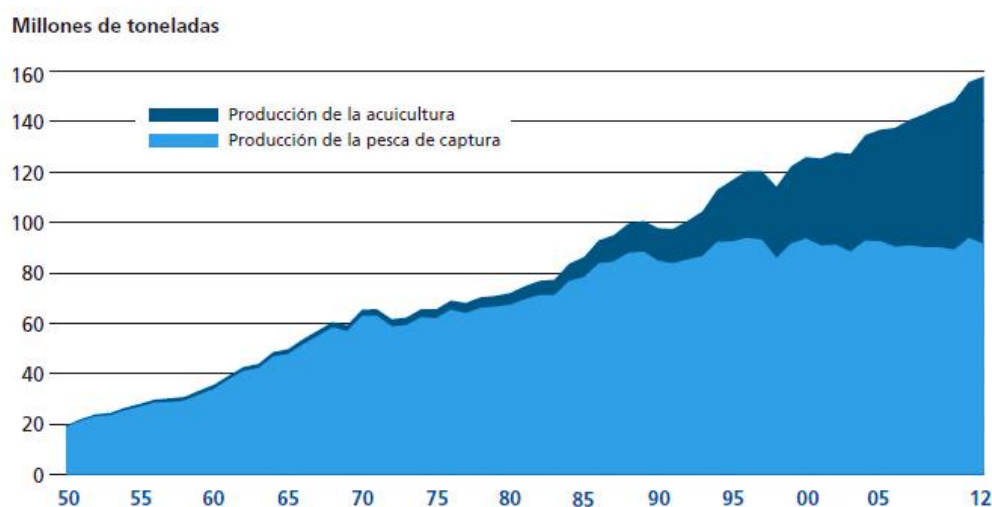


Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (FAO 2014)

La pesca alcanzó su producción máxima en 1996 con 86,4 millones de toneladas, y desde entonces se ha mantenido constante (Figura 1). Estas capturas se están volviendo cada vez más insostenibles y las estadísticas de la FAO lo corroboran. Las poblaciones sobreexplotadas a un nivel biológicamente insostenibles han ido aumentando hasta llegar a un 33,1% en 2015 (FAO, 2018), lo que les hace tener una abundancia inferior a la necesaria para autorrenovarse.

Se estima que para 2100 la población mundial será de más de 11 mil millones de habitantes (Naciones Unidas, 2017), por lo que la demanda de recursos pesqueros seguirá creciendo, aunque el consumo *per capita* se mantenga. Por lo tanto, esta creciente demanda se tendrá que satisfacer incrementando la producción acuícola. De hecho, la acuicultura sigue una tendencia mundial al alza (Figura 1) consiguiendo una producción de 80 millones de toneladas en 2016, siendo en ese mismo año la producción por capturas de 90,9 millones de toneladas. Por lo que la acuicultura actual ya supone casi el 50% de la producción total (FAO, 2018). Según la FAO, “la acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción”. El futuro de la acuicultura pasa por seguir investigando para optimizar los cultivos y conseguir mayor rentabilidad con el mínimo impacto medioambiental posible.

La actividad pesquera desempeña un papel fundamental desde la antigüedad en los pueblos ribereños del mediterráneo durante toda la antigüedad, desde antes y después del Imperio Romano (Blázquez, 2006). Las especies de mayor volumen de producción acuícola en la cuenca Mediterránea son el mejillón, la ostra, la dorada y la lubina respectivamente. El presente trabajo se centra en el cultivo de una de estas especies, concretamente en la dorada, especie de la que se debe mejorar su cultivo para satisfacer su creciente demanda en el mercado. Es una especie muy apreciada por su carne y de fácil manejo en acuicultura (Ortega, 2008), por lo que la hace ser clave en la acuicultura nacional.

1.2. Características biológicas de la dorada

La dorada (*Sparus aurata* Linneo, 1758) es un teleósteo marino de la Familia *Sparidae* que se distribuye por todo el Mediterráneo, así como por las costas orientales del Atlántico (Reig, 2001). Se trata de una especie euriterma y eurihalina. Es sensible a las bajas

temperaturas, dejando de alimentarse a temperaturas inferiores de 12 °C, aunque puede soportar temperaturas más bajas (Ortega, 2008). A pesar de ser una especie gregaria, suele vivir en solitario o formando grupos poco numerosos. Su alimentación es carnívora, basándose en moluscos, bivalvos y pequeños peces o incluso cefalópodos (Heinzpeter, 2018). Habitan principalmente en el litoral, desde la zona superficial hasta los 90 metros de profundidad. Los alevines y juveniles viven cerca de la costa, en zonas menos profundas. En primavera pueden entrar en las desembocaduras de los ríos y lagunas litorales, para buscar mejores condiciones de alimentación, emigrando a mediados de otoño a zonas de mayor profundidad, donde las condiciones son menos extremas que en las lagunas costeras (Audouin, 1962). También pueden encontrarse refugiados, al igual que de otras especies de teleósteos, en praderas de angiospermas marinas costeras (Verdiell-Cubedo et al., 2007) .

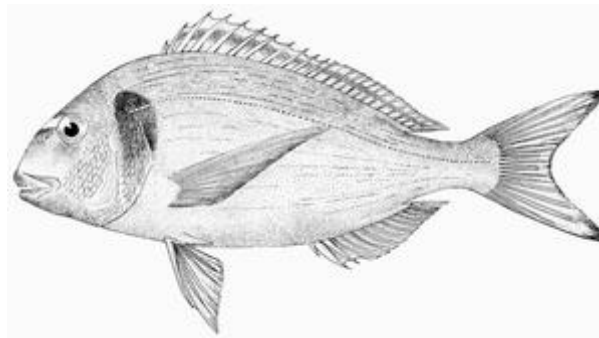


Figura 2. Boceto de una Dorada (*Sparus aurata*)

La dorada es la única especie de su familia que se cría a gran escala. Su cultivo comenzó de una manera extensiva en las lagunas costeras, y no fue hasta los años 80 cuando se reprodujo con éxito en cautividad. Tras ello, comenzaron a desarrollarse sistemas intensivos, siendo en la década de los 90 cuando se produjo el auge de su cultivo, gracias a las jaulas en alta mar (Ortega, 2008).

Actualmente, se ha convertido en una de las principales especies cultivadas a nivel europeo. En el Mediterráneo, el principal productor es Grecia, seguidos de Turquía, España e Italia (Figura 3). Estos 4 países representan más del 90% de la producción mundial de dorada (Zohar et al., 1995; APROMAR, 2018).

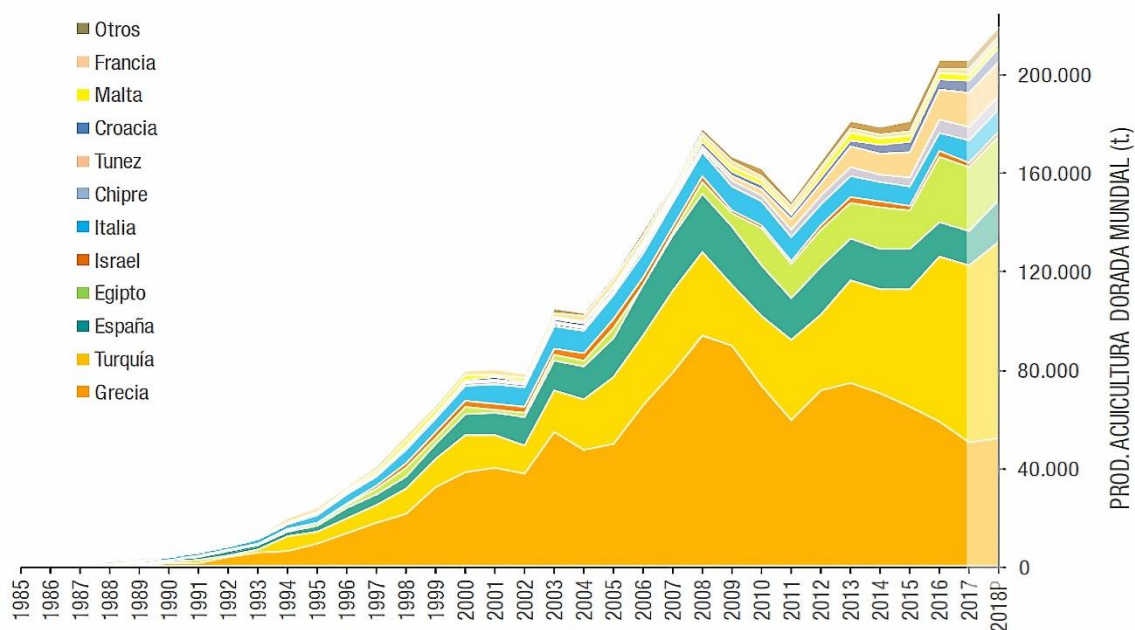


Figura 3. Producción acuícola mundial de dorada (APROMAR 2018)

1.3. La importancia de la frecuencia de alimentación en la acuicultura, y concretamente en el cultivo de doradas

Para un desarrollo sostenible de la acuicultura es fundamental seguir investigando para mejorar las técnicas de cultivos y reducir el impacto de la actividad en el medio. En este sentido, en los últimos años se ha comprobado como la nutrición juega un papel clave en el desarrollo de la producción en el sector acuícola. Diversos estudios sobre la alimentación de teleósteos [ej. salmón atlántico (*Salmo salar*): Sun et al., 2016; lubina asiática (*Lates calcarifer*): Salama, 2008; lubina europea (*Dicentrarchus labrax*): Messina et al., 2014] resaltan la importancia de la frecuencia de alimentación diaria para la optimización del cultivo. En la dorada se conoce la capacidad de adaptación que tienen a un determinado momento de alimentación, siendo capaces de modificar su actividad locomotora y enzimática varias horas antes de la hora de comida a la que se le han aclimatado previamente (Montoya et al., 2010; Vera et al., 2013; Yufera et al., 2014). Esta adaptación sumada a una determinada frecuencia de alimentación puede ser la clave para optimar los cultivos acuícolas (Jobling, 1981; Yufera et al., 2018). Existen numerosos y recientes estudios sobre la nutrición en la dorada, sin embargo, el efecto derivado de diferentes frecuencias de alimentación sigue siendo poco conocido (Yúfera et al., 2014, 2018), siendo una cuestión en la que se necesita profundizar. Por ello, es

importante mejorar la comprensión fisiológica de esta especie para poder diseñar un protocolo de alimentación que consiga optimizar su digestión, para así incrementar sus tasas de crecimiento y engorde y disminuir la cantidad de residuos orgánicos procedentes de su cultivo.

1.4. Impactos de la acuicultura en el medio ambiente

La actividad acuícola también presenta un importante impacto medioambiental. Este impacto depende del método de cultivo, la especie cultivada, la densidad del stock, el tipo de alimentación y las condiciones hidrográficas (Borja, 2002; Vergara et al., 2005). Además, también existe una amenaza genética para la población salvaje colindante, en caso de procesos de escapes de ejemplares cultivados.

Actualmente la técnica más utilizada en el cultivo de doradas en la región Mediterránea son las jaulas flotantes (Vergara, 2000), por lo que nos centraremos en su impacto en el medio. Los desechos que se producen, tanto orgánicos como inorgánicos, causan un incremento de nutrientes en la zona, que incluso puede dar lugar a problemas de eutrofización en zonas con tasas de renovación de agua menores como bahías y estuarios. En torno al 80% del fósforo y del carbono y entre un 50-90% del nitrógeno del pienso suministrado acaba en el medio marino a través de los restos de comida, la excreción de los peces y su respiración (Vergara et al., 2005). El impacto es significativo en un área de un kilómetro alrededor de las jaulas. Dichas jaulas producen una mayor incidencia en el fondo, donde se ha visto un aumento en la demanda de oxígeno, aparición de sedimentos anóxicos y gases tóxicos, cambios en las comunidades biológicas, disminución en la diversidad del bentos, variaciones en la biodiversidad e incluso blooms fitoplanctónicos (Borja, 2002).

Todos estos impactos deben minimizarse para proteger y conservar el medio marino, buscando un desarrollo más sostenible de la actividad, siendo competitiva y que, al mismo tiempo, logre aumentar la resiliencia de los ecosistemas ante los efectos del cambio global y las actividades humanas. Para que el crecimiento de la acuicultura sea sostenible, su modelo de desarrollo debe basarse en la economía azul, mejorando el bienestar humano y reduciendo al mismo tiempo los riesgos ambientales y los daños ecológicos (Ivanova et al., 2017).

1.5. Importancia de los ecosistemas costeros: Las angiospermas marinas

La zona costera representa una limitada área del planeta (alrededor del 18%), pero que es de gran importancia por su papel en los ciclos biogeoquímicos, la gran variedad de ecosistemas y biodiversidad que sustentan y su gran productividad (Gattuso et al., 1998).

Los principales ecosistemas costeros son los estuarios, lagunas costeras, manglares, arrecifes coralinos, playas, humedales y fanerógamas marinas (Mendoza, 2004). Estos ecosistemas costeros son considerados los ecosistemas con mayor producción primaria global que alimentan una compleja red trófica, favoreciendo así a la producción pesquera (Mendoza, 2004). Estos ecosistemas proporcionan numerosas funciones ecosistémicas, de las que podemos destacar: i) protección contra la erosión costera (Christianen et al., 2013), ii) depuración del agua (Waycott et al., 2009), iii) regeneración de nutrientes (Costanza et al., 1997), iv) oasis de biodiversidad (Ruiz et al., 2015), v) mantenimiento de las pesquerías (Mendoza, 2004) y vi) el secuestro de carbono mitigando el cambio climático (Fourqurean et al., 2012). Sin embargo, durante las últimas décadas, las presiones causadas por la actividad humana en las zonas costeras están incrementando las tasas de deterioro y pérdida de la superficie de estos ecosistemas costeros en todas las costas del planeta (Boudouresque et al., 2009; Waycott et al., 2009; Short et al., 2011).

Las angiospermas marinas representan el único grupo de plantas superiores que han colonizado el medio marino procedente de especies terrestres. Se clasifican en 4 familias, *Posidoniaceae*, *Cymodoceaceae*, *Zosteraceae* e *Hydrocharitaceae* (Costanza et al., 1997; Ruiz et al., 2015). Forman densas poblaciones que ocupan grandes extensiones a lo largo de la línea de costa de todos los continentes, a excepción de la Antártida. Pueden llegar a colonizar zonas de hasta 50 metros de profundidad cuando la transparencia del agua lo permite (Hemminga & Duarte, 2000). Su proximidad a los impactos litorales antropogénicos conlleva que estos hábitats se encuentren entre los más amenazados del mundo, con tasas de pérdida de pradera de hasta el 7% anual (Waycott et al., 2009).

En este trabajo nos centraremos en las praderas de angiospermas marinas, también conocidas como fanerógamas marinas, dado que son un ecosistema clave en nuestra latitud y cruciales para el mantenimiento de las pesquerías, sirviendo de cobijo a alevines de peces de multitud de especies (Unsworth et al., 2018). Las praderas de angiospermas marinas constituyen uno de los ecosistemas más ricos e importantes de los ecosistemas costeros (Short et al., 2011) gracias a su gran productividad y biodiversidad.

Sin embargo, a pesar de la gran importancia que tienen por todos los servicios y funciones ecosistémicas que proporcionan, estas praderas forman un ecosistema generalmente poco conocido (Duarte et al., 2008). Una de las mayores amenazas a la que están expuestas las angiospermas marinas es la eutrofización (Burkholder et al., 2007; Ruiz et al., 2015), agravado por el hecho de que la población humana cada vez vive más cerca de la costa (Ruiz et al., 2015; Jimenez-Ramos et al., 2017). La eutrofización es un aumento en la concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, a un ecosistema acuático (Nixon, 1995).

En este trabajo se ha utilizado una especie de angiosperma marina de la familia de las *Zosteraceae*, concretamente *Zostera noltei*. Es una especie eurihalina que aguanta bien las extremas condiciones ambientales que se dan durante los periodos de emersión en el intermareal, y son capaces de soportar altos grados de contaminación (Ruiz et al., 2015). Esta especie presenta una estructura formada por raíces, rizomas y hojas. Sus hojas son acintadas, agrupadas en unidades llamadas haces, de 4-5 hojas. Los haces se clasifican en 3 categorías: apicales (haces que muestran crecimiento horizontal rizomático), laterales (haces que surgen de las axilas del rizoma) y verticales (haces cortos que provienen de un rizoma más viejo o completamente descompuesto) (Brun, et al., 2003b; Brun, et al., 2006). Además, al ser un especie de rápido crecimiento responde rápidamente a los cambios medioambientales (Peralta et al., 2002). Por todo ello es una especie idónea para investigar el impacto de la actividad acuícola en estas comunidades.



Figura 4. Pradera intermareal de *Zostera noltei* durante la bajamar (Asturias, Estuario de Villaviciosa) (foto: Ignacio Fernández)

La praderas de angiospermas marinas son ecosistemas gravemente amenazados por la actividad humana, siendo reconocidos como indicadores de calidad ambiental, de acuerdo con la Directiva Marco de Agua de la UE (2000/60/CE). Las praderas de *Zostera noltei*

se catalogan como vulnerables en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, y en Andalucía, están incluidas en el Listado Andaluz de Especies Silvestres de Régimen de Protección Especial (Decreto 23/2012).

1.6. Impactos de la actividad acuícola en las praderas de angiospermas marinas

Los cultivos acuícolas, como las jaulas flotantes, pueden suponer un gran impacto para las praderas de angiospermas marinas, tanto a nivel de comunidad como fisiológico, a consecuencia del incremento en la concentración de nutrientes. Por un lado, el exceso de nutrientes favorece la proliferación de especies de rápido crecimiento (fitoplancton, epífitos y macroalgas) que compiten con las plantas por la luz, produciendo una menor tasa de fotosíntesis y limitando su crecimiento (Ruiz & Romero, 2001, 2003; Brun et al., 2003a; Moreno-Marín et al., 2016). Además, el exceso de nutrientes afecta a la palatabilidad de las plantas lo que modifica la presión de la herbivoría en este ecosistema (Jimenez-Ramos et al., 2018). El exceso de nutrientes también produce un incremento en la acumulación de compuestos reducidos nitrogenados y sulfurados del sedimento que incrementa el riesgo de anoxia y toxicidad de sulfuros (Brun et al., 2002; Calleja et al., 2007; Holmer & Bondgaard, 2001). Por otra parte, a nivel fisiológico, ante un exceso de nitrógeno se puede producir un desequilibrio en la economía de carbono en estas plantas como consecuencia de la demanda interna de energía y esqueletos de carbono necesarios para la asimilación rápida del amonio (es decir, la síntesis de aminoácidos y proteínas). Esta demanda de carbono se satisface con recursos desviados del crecimiento y otros procesos metabólicos (Marschner, 1995; Brun et al., 2002, 2008; Villazán et al., 2013; Egea et al., 2018) y que en última instancia puede hacer que las plantas se vuelvan más vulnerables ante otras presiones como las derivadas del cambio climático.

1.7. Hipótesis y objetivos

El desarrollo de una acuicultura basada en un crecimiento sostenible, que aproveche los recursos con eficacia, que sea competitiva, y que, al mismo tiempo logre aumentar la resiliencia de los ecosistemas ante los efectos del cambio climático marcará el futuro de la investigación en esta disciplina en los próximos años. En base a esto, los Objetivos Generales de este Trabajo de Fin de Grado son dos:

i) evaluar como cambios en la frecuencia de alimentación pueden afectar al crecimiento de *Sparus aurata*.

ii) determinar si dicho cambio en la frecuencia de alimentación puede afectar a la concentración de productos de desecho en el efluente y evaluar el efecto del agua desechada en comunidades dominadas por la angiosperma marina *Zostera noltei*.

Las hipótesis planteadas son las siguientes:

1. Se espera que la frecuencia de alimentación afecte tanto al crecimiento como al metabolismo de los ejemplares de dorada.
2. Se espera que diferentes frecuencias de alimentación produzcan cambios en las condiciones fisicoquímicas del agua efluente de la actividad acuícola.
3. Se espera un deterioro de la comunidad de *Zostera noltei* al someterse a los efluentes de agua de actividades acuícolas.
4. Se espera que al aumentar la frecuencia de alimentación disminuirá el impacto de la actividad acuícola.

Para ello se llevó a cabo un cultivo en mesocosmos de *Sparus aurata* durante 79 días bajo diferente frecuencia de alimentación junto con un cultivo en mesocosmos de comunidades de *Zostera noltei* durante 4 semanas (incluyendo tanto a la planta como a todos los organismos asociados: epífitos, algas, fauna bentónica, etc.) sometida al agua desechada del cultivo anterior. Así, este trabajo presenta los siguientes 3 objetivos específicos:

- Determinar el efecto de diferentes frecuencias de alimentación sobre el crecimiento y el metabolismo de doradas.
- Cuantificar los niveles de concentración de materia orgánica (MO) y nutrientes registrados en el agua desechada del cultivo de doradas con diferentes frecuencias de alimentación.
- Evaluar el estado de conservación (crecimiento, producción y biodiversidad) de la comunidad de *Zostera noltei* tras la exposición del agua desechada de los cultivos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

El presente Trabajo de Fin de Grado presenta dos partes claramente diferenciadas, pero coordinadas entre sí: i) El cultivo de peces con diferente frecuencia de alimentación y ii) el cultivo de comunidades de angiospermas marinas con agua desechada del cultivo de peces.

2.1.1. Cultivo de peces con diferente frecuencia de alimentación

La especie de teleósteo elegida para la primera parte del trabajo fue la dorada (*Sparus aurata*) debido a su masiva utilización en la acuicultura española como a su alta plasticidad ambiental. Los ejemplares fueron proporcionados por los Servicios Centrales de Investigación de Cultivos Marinos (SCI-CM, Operational Code REGA ES11028000312) localizado en el Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos (CASEM, Puerto Real, Cádiz) de la Universidad de Cádiz.

Un total de 90 ejemplares de dorada fueron seleccionadas con un peso medio de $135,1 \pm 26,2$ g y de longitud furcal $18,9 \pm 1,2$ cm. Los peces fueron distribuidos en 9 tanques de 400 L de capacidad, con un volumen utilizado de 350 L, en las instalaciones del SCI-CM. Se depositaron un total de 10 peces por tanque a una densidad constante de 4 Kg m^{-3} , salinidad media de 37,7 ‰, una temperatura de 19 °C y bajo condiciones de fotoperiodo natural del 13 de marzo hasta el 31 de mayo, 2018 (12h Luz:12h Oscuridad) para la latitud geográfica de la Bahía de Cádiz, España (36° 31' N y 6° 12' W).

Los tanques tenían una renovación de 60 L h^{-1} en régimen de circuito abierto con agua procedente del acuífero subterráneo que suministra el agua al SCI-CM. El agua viene filtrada de manera natural desde el mar, siendo su concentración en nutrientes muy baja y con una salinidad adecuada, aunque pobre en oxígeno, por lo que se utilizan bombas de aireación en los tanques de cultivo. Este agua procedente del acuífero subterráneo se utilizará también en el control del cultivo de comunidades de angiospermas marinas.



Figura 5. Foto de los tanques experimentales de doradas con comederos automáticos (SCI-CM, CASEM, Universidad de Cádiz) (foto: David Sánchez)

Con el objetivo de estudiar el efecto de la frecuencia de alimentación en su desarrollo, esta especie fue cultivada un total de 79 días con 3 tratamientos consistentes en 3 diferentes frecuencias de alimentación con 3 réplicas cada uno. Las frecuencias de alimentación utilizadas fueron las siguientes:

Tratamiento A: Tanques alimentados con una sola dosis diaria a las 9:00 al 2% del peso medio húmedo.

Tratamiento B: Tanques alimentados con dos dosis diaria a las 9:00 y las 15:00 al 1% del peso medio húmedo.

Tratamiento C: Tanques alimentados con tres dosis diaria a las 9:00, 15:00 y 18:00 respectivamente, al 0,67% del peso medio húmedo.

Con este procedimiento se consigue que al final de cada día el porcentaje suministrado a todos los tanques sea el mismo, y lo que varía es la frecuencia de alimentación. Cada 15-20 días se realizó un muestreo biométrico de los peces en los tanques para ajustar la cantidad de alimento suministrado. Los peces se mantuvieron en ayunas las 24 horas anteriores a estos muestreos.

Durante todo el periodo experimental, de lunes a viernes se limpiaba el fondo minuciosamente con un sifón para eliminar las heces y los restos de comida, y se pasaba

una bayeta por las paredes para eliminar las algas adheridas. Los animales fueron alimentados diariamente, exceptuando los domingos, con la ayuda de comederos automáticos de la marca Eheim, que se comprobaban y rellenaban tras la limpieza diaria. El pienso utilizado fue de la casa Skretting S. A. del tipo D-4, lo que representa el diámetro del pienso. Los peces se mantuvieron sin renovación de agua las 24 horas anteriores a la recogida del agua desechada para el cultivo de la comunidad de angiosperma marina (segunda parte del experimento).

Antes de comenzar con el cultivo de la comunidad de angiosperma marina, se realizó un muestreo de agua en los tanques de dorada en función de la frecuencia de alimentación para ver como varía la concentración de nutrientes y de materia orgánica (MO) a lo largo del día (se recogió una muestra por cada réplica de cada tratamiento):

Tabla 1. Horas de recogida de muestras de agua en los tanques de dorada en función de la frecuencia de alimentación

Hora	9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	20:00	21:00
Tratamiento A	1	1	1	1			1			1			1
Tratamiento C	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1

Hora	22:00	23:00	0:00	1:00	2:00	3:00	4:00	5:00	6:00	7:00	8:00	9:00
Tratamiento A			1			1			1			1
Tratamiento C			1			1			1			1

2.1.2. Cultivo de praderas de angiospermas marinas con agua procedente del cultivo de peces

La especie seleccionada para esta fase del experimento fue *Zostera noltei* debido a su rápido crecimiento, lo que debe permitir ver resultados más claros en un experimento de corta duración como el planteado (4 semanas). Esta segunda parte del trabajo se realizó en el laboratorio húmedo del Área de Ecología del Departamento de Biología de la Universidad de Cádiz, situado en el CASEM, justo al lado de las instalaciones del SCI-CM, lo que facilitó el traslado del agua de los tanques hacia los acuarios correspondientes.

Con el objetivo de estudiar el efecto producido en las comunidades de angiospermas marinas por el agua procedente del cultivo de peces con diferente frecuencia de alimentación, se llevó a cabo un diseño experimental en el que las comunidades

dominadas por *Z. noltei* fueron cultivadas con el agua procedente de los cultivos de peces explicados anteriormente.

La complejidad en el cultivo y mantenimiento de estas comunidades en condiciones de laboratorio durante un mes hizo necesario reducir los tratamientos a dos, usando el agua procedente de los 2 tratamientos de peces con la frecuencia de alimentación más extrema (tratamientos A y C). De esta forma, se establecieron 3 tratamientos en esta segunda parte del experimento, con 3 réplicas cada uno, dos cultivados con el agua procedente del cultivo de peces anterior junto con un tratamiento control con agua procedente del acuífero subterráneo que sustenta los tanques de peces (Figura 6).

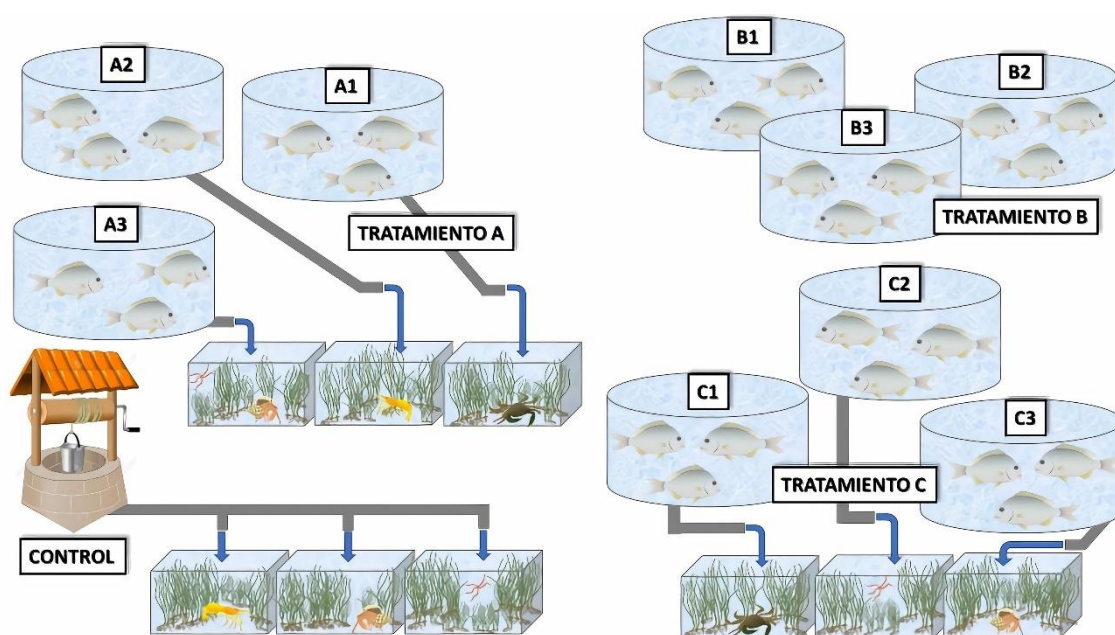


Figura 6. Esquema del experimento: Cultivo de doradas + Cultivo de comunidades de angiospermas marinas.

En el cultivo de comunidades de angiospermas marinas se utilizaron acuarios de 25 L (36,5 x 26 x 26 cm) con un volumen real de 20 L por acuario. Dichos acuarios se situaron en una cámara de cultivo climatizada (EMR 300-500 LXPD) a temperatura constante de $20,02 \pm 0,02$ °C y luz incidente sobre la pradera de $210 \pm 7,1$ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La temperatura y la luz incidente sobre la pradera fue medida cada 3-4 días con un registrador de datos del Data Logger HOBO Pendant, y la salinidad fue medida semanalmente mediante un conductímetro (CM35) de la marca Crison. Para producir los diferentes niveles de luz, los acuarios se iluminaron con pantallas de 6 tubos fluorescentes de luz fría (T5 High Output Blau Aquaristic) en un ciclo de 16:8 h (Luz:Oscuridad). Para simular el paso de

luz a oscuridad y viceversa al de la naturaleza, el encendido y apagado de los tubos fue programado de manera progresiva de forma que iban encendiéndose o apagándose de dos en dos con intervalos de 30 minutos. Así se evita el estrés de las plantas y la comunidad asociada por cambios bruscos en el metabolismo. Cada acuario disponía de burbujeo constante proporcionado a través de una bomba de aire. Todas las semanas se rascaban los cristales de los acuarios para eliminar la proliferación de algas adheridas y así evitar la disminución de la luz incidente sobre la pradera de angiosperma marina.

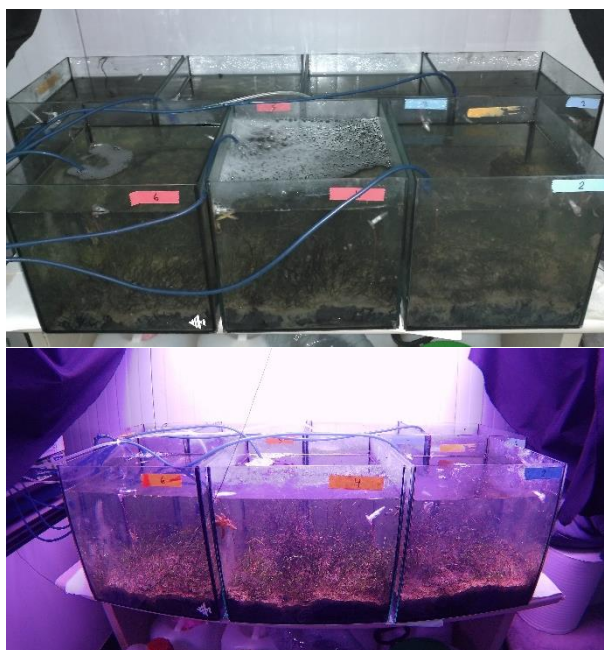


Figura 7. Fotos de los acuarios experimentales con las comunidades de *Z. noltei* (Foto: David Sánchez)

Antes de iniciar el experimento, las comunidades de angiospermas marinas fueron aclimatadas durante una semana con agua de mar tomada directamente del acuífero subterráneo. Una vez aclimatadas, se comenzó a utilizar el agua procedente del cultivo de peces. Los acuarios se instalaron en régimen de circuito cerrado de agua renovándose al 100% del volumen de cada acuario cada 7 días con el agua procedente del tratamiento de peces correspondiente o del agua del acuífero usado para el tratamiento control.

2.2. Recolección de peces y comunidades de angiospermas marina

Los peces utilizados en el experimento fueron suministrados por el SCI-CM (CASEM, Universidad de Cádiz, Puerto Real, Cádiz; Código REGA ES11028000312).

Las comunidades dominadas por la angiosperma marina *Zostera noltei* fueron recolectadas durante la bajamar directamente del medio natural en la zona intermareal de

Santibañez (36.47N 6.25W), situada en el saco interno de la Bahía de Cádiz, una laguna mareal de 5 km de diámetro con una profundidad media de 3 metros. (González-Ortiz, 2009) (Figura 8). En esta zona se encuentran 3 de las 4 especies de fanerógamas marinas europeas, *Zostera noltei*, *Zostera marina* y *Cymodocea nodosa*, siendo la especie ausente *Posidonia oceanica*, endémica del Mediterráneo (Hernández et al., 2010). Santibañez presenta una zona submareal arenosa-fangosa donde predomina *C. nodosa*, y una zona intermareal donde conviven *C. nodosa* y *Z. noltei*, localizándose también aquí pequeños rodales de *Z. marina*. También conviven con ellas otros macrófitos marinos como el alga enraizante *Caulerpa prolifera* (Vergara et al., 2012).



Figura 8. Localización de la zona de recolección de comunidades de *Zostera noltei* (Google Maps)

La recolección se llevó a cabo extrayendo la comunidad completa, es decir, toda la pradera junto con su sedimento, hasta unos 5 cm de profundidad y toda la comunidad asociada (tanto algas como fauna bentónica). Para alterar lo menos posible la pradera se trasladaron los acuarios *in situ* y se extrajeron porciones de pradera completas para los 9 acuarios del mismo tamaño que la base de éstos (Figura 9). Las 9 porciones fueron tomadas al azar de una extensa, saludable y desarrollada pradera de *Z. noltei* con una separación mínima de 7 metros entre ellas. Los acuarios con la comunidad bentónica completa se rellenaron con un poco de agua de mar de la propia zona para mantener la humedad y temperatura de la pradera durante su traslado hasta las instalaciones de la

Universidad de Cádiz. El traslado fue en unos 30 minutos de forma que el estrés por recolección y traslado fue el mínimo posible. Ese mismo día se recogió un pool inicial de la pradera para conocer su estado. Cada dos semanas se volvía al mismo punto para recoger haces apicales que posteriormente se introducirían en los acuarios de las angiospermas marinas.



Figura 9. Fotos de la recolección de comunidades de *Zostera noltei*. (foto: Luis G. Egea)

2.3. Análisis en laboratorio

2.3.1. Muestras procedentes del cultivo de peces con diferente frecuencia de alimentación

Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo siguiendo las directrices dadas por el Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE), legislación española (RD 1201/2005 y ley 32/2007) y la Universidad de Cádiz para el uso de animales de laboratorio.

Para la realización de los muestreos biométricos (peso y longitud) los ejemplares fueron anestesiados con 2-fenoxietanol, utilizando una dosis de 0,5 ml L⁻¹ de agua. Para el muestreo fisiológico final se utilizó una sobredosis de 1 ml L⁻¹ de agua de 2-fenoxietanol para el sacrificio (Figura 11).

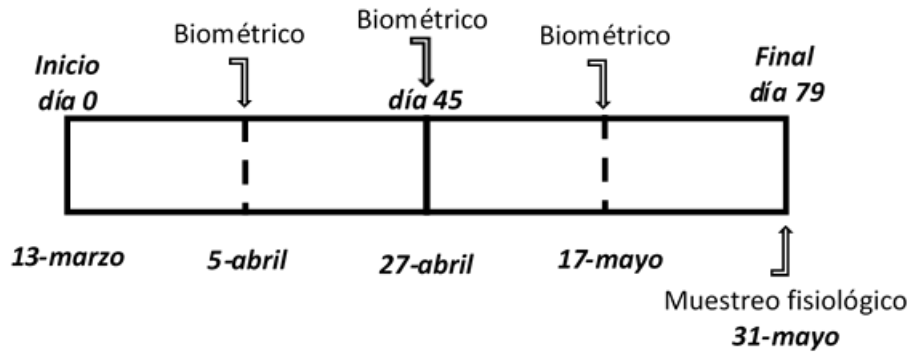


Figura 11. Muestreos realizados a los ejemplares de dorada

Con los datos obtenidos durante los muestreos se calculó la evolución del crecimiento en peso (g) y longitud furcal (cm) de todos los ejemplares de dorada además de los siguientes índices biométricos y nutricionales (Millán-Cubillo et al., 2016):

- Factor de Condición (K): expresa la relación volumétrica en función del peso.

$$K = \frac{[peso(g)*100]}{(longitud\ total)^3}$$

- Ganancia de peso (WG)

$$WG = \left[\frac{peso\ húmedo\ final(g) - peso\ húmedo\ inicial\ (g)}{peso\ húmedo\ inicial\ (g)} \right] * 100$$

- Tasa específica de Crecimiento (SGR): se define como la variación del peso corporal a lo largo del tiempo (%).

$$SGR = \frac{[(\ln Pf - \ln Pi)*100]}{t}$$

Siendo Pf: peso final y Pi: peso inicial

- Factor de conversión (FCR): es la cantidad de alimento en gramos que necesita el animal para engordar un gramo de peso.

$$FCR = \frac{Alimento\ total\ suministrado(g)}{Ganancia\ de\ peso\ (g)}$$

- Velocidad de alimentación específica (SFR)

$$SFR = \left[\frac{alimento\ suministrado\ diario(g)/masa\ corporal\ total\ (g)}{t} \right] * 100$$

En el muestreo final se sacrificaron 27 ejemplares de doradas (3 ejemplares por tanque / 9 ejemplares por tratamiento). Se obtuvieron muestras de plasma sanguíneo, de aproximadamente 0,5 mL, obtenidas por punción del pedúnculo caudal utilizando jeringas de 1mL previamente heparinizadas para evitar su coagulación, y se recogieron en tubos Eppendorf de 1,5 mL, también heparinizados con 10 µL. Posteriormente fueron centrifugadas durante 5 minutos y se extrajeron 3 alícuotas obtenidas del sobrenadante de la centrifugación que se depositaron en tubos Eppendorf de 0,5 mL que fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta el posterior análisis de metabolitos (glucosa, lactato, proteínas y triglicéridos). De cada animal sacrificado se obtuvo el peso total del hígado (utilizado para cálculo del índice hepatosomático (IHS) = $[\text{Peso del hígado (g)} / \text{Peso total (g)}] * 100$) y se tomó una porción que se depositó en un tubo de Eppendorf de 1,5 mL, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó posteriormente a -80 °C hasta su posterior homogeneizado y análisis de metabolitos (glucosa, glucógeno, y triglicéridos). Para el homogenizado se realizó la desproteinización a partir de una solución de ácido perclórico 0.024 N (Merck KGaA, 1.00518.1001), homogenización mediante instrumento de dispersión de alto rendimiento (T 25 digital Ultra-Turrax®) y posterior neutralización con una solución básica de bicarbonato potásico 1 M (Merck KGaA, 1.04854.0500), resultando una dilución 15 veces el peso del tejido. Después de mezclar en el agitador tipo vortex, el siguiente paso fue la centrifugación de cada muestra durante 30 minutos a 3,250 g y 4 °C, y su posterior recogida y distribución en alícuotas de la fase acuosa resultante, en la que quedaron suspendidos los metabolitos objeto de medición.

Todas las técnicas de análisis utilizadas, tanto en el plasma sanguíneo como en el hígado, se basan en reacciones colorimétricas que dan lugar a un compuesto a partir del cual podemos determinar su concentración mediante la lectura de absorbancias en un espectrofotómetro y su comparación con estándares, en nuestro caso un lector de microplacas PowerWave™ 340 de BIO-TEK. Las lecturas tomadas en microplacas de 96 pocillos se procesan con el software KC Junior™ de BIO-TEK, y cuyos resultados se exportaron a Excel para tratar los diferentes datos.

Usando kits comerciales de Spinreact (Spinreact SA, Sant Esteve d'en Bas, Girona, España), y mediante la adaptación de las mediciones a microplacas de 96 pocillos, los parámetros metabólicos que fueron analizados tanto en plasma como hígado incluyeron

los niveles plasmáticos de glucosa (Glucose-HK Ref. 1001200) y lactato (Lactate Ref. 1001330), y los niveles tanto plasmáticos como hepáticos de triglicéridos (TAG Ref. 1001311). Para el caso de la medición de proteínas plasmáticas se utilizó el método del ácido bicinonínico con el kit de proteínas BCA (BCATM Protein assay kit, Pierce, Rockford, EE.UU.) con el estándar de albumina procedente de suero bovino. Para el caso del glucógeno hepático se utilizó el método descrito por Keppler y Decker (1974). Así, una vez obtenida la glucosa total almacenada después de la ruptura de glucógeno, y tras restar los niveles de glucosa libre en el tejido hepático, fue posible la determinación de este metabolito con el kit específico de Spinreact siguiendo el mismo procedimiento espectrofotómetro descrito anteriormente.

2.3.2. *Materia orgánica y nutrientes*

La recogida de muestras de agua para el análisis de nutrientes y MO se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento repetido semanalmente durante las 4 semanas de periodo experimental (se recogió una muestra por cada réplica de cada tratamiento):

1. Recogida de muestras de agua del acuífero antes de su entrada en los tanques de cultivo de doradas.
2. Recogida de muestras de agua en los tanques de cultivo de doradas tras 24 horas sin renovación de agua y siguiendo la frecuencia de alimentación estipulada para cada tratamiento. Esta muestra servirá como muestra final para estudiar cambios en los parámetros de MO y nutrientes tras el cultivo de peces y como muestra inicial para la comunidad de *Z. noltei*.
3. Renovación del 100% del agua de los acuarios de praderas de *Z. noltei* con el agua procedente de 24 horas del cultivo de doradas sin renovación.
4. Recogida de muestras de agua en los acuarios con comunidades de *Z. noltei* tras 24 horas desde su renovación.
5. Recogida de muestras de agua en los acuarios con comunidades de *Z. noltei* tras 72 horas desde su renovación.

Para la recogida de muestras de agua, tanto de los tanques como de los acuarios, se utilizó una jeringuilla con la incorporación de un filtro en su punta, obteniendo 50 mL de agua filtrada por muestra. Los filtros utilizados se combustionaron previamente en un horno mufla 30 min a 500 °C y se pesaron, obteniéndose su peso inicial. Tras el filtrado, se

pusieron a secar en una estufa a 60 °C durante 48h, y se volvieron a pesar. Por último, se combustionaron 2h a 500 °C y se volvieron a pesar. Con este procedimiento se puede obtener por diferencia de peso tanto la materia orgánica como la inorgánica.



Figura 10. Foto del horno mufla utilizado para la combustión de los filtros para la recogida de muestras de agua (foto: David Sánchez)

Todas las muestras de agua recogidas fueron enviadas al Instituto Universitario de Investigación Marina (INMAR). Dichas muestras fueron analizadas por el personal del INMAR a través de un analizador de flujo segmentado desarrollado para la cuantificación de nutrientes. Concretamente, se analizó la concentración de amonio, nitrato, nitrito y fosfato de las muestras. El equipo utilizado se llama Autosampler SA1050 de la marca SKALAR SAN^{plus}.

2.3.3. *Angiospermas marinas*

A lo largo del experimento, se tomaron medidas morfológicas, de crecimiento, de concentración de azúcares y de mortalidad de las plantas, así como de diversidad y abundancia de fauna asociada, con el fin de analizar el efecto que produce el agua desechada del cultivo de doradas sobre la comunidad de *Zostera noltei*. De esta forma se obtuvieron datos de resistencia de la comunidad a los diferentes tratamientos. Las variables medidas fueron las siguientes:

A. Morfología y crecimiento de plantas

Al comienzo del periodo experimental, se analizaron 3 muestras iniciales de 400 cm² de la pradera de *Z. noltei* (pool inicial) para conocer el estado de la comunidad en condiciones naturales. Se tomaron 5 plantas de cada muestra para medir su peso fresco,

el número de hojas, longitud, anchura y grosor de las hojas. Este procedimiento se repitió al final del periodo experimental, tras el desmantelamiento de los acuarios, para analizar las diferencias producidas por los distintos tratamientos. Además, en cada acuario se clasificaron todos los haces encontrados y se pesó la biomasa aérea y subterránea. Por otra parte, se recolectó un pool de plantas al azar cada 10-12 días durante el periodo experimental del mismo lugar donde se tomaron las comunidades para el estudio.

Las plantas fueron transportadas en menos de una hora al laboratorio donde se seleccionaron las más saludables. Estas plantas se mantuvieron aclimatándose durante 3 días en el laboratorio antes de plantarlas en los acuarios. Se seleccionaron 3 plantas con 3-4 haces cada una (siempre con un haz apical) por acuario que fueron marcadas con un Eppendorf e introducidas en los acuarios. Antes de la introducción en los acuarios y tras los 10-12 días en el interior de estos, se tomaron medidas del número de haces, tipo de haz (apical, vertical o lateral), peso fresco (g), longitud (cm) de todas las hojas, grosor (mm) y anchura (mm) de la hoja marcada. Las medidas de grosor se tomaron con un micrómetro y las de anchura con un calibre digital.

Para determinar el crecimiento a lo largo del periodo experimental, se realizó la tasa de incremento diaria utilizando los resultados obtenidos de las plantas marcadas e introducidas cada 10-12 días. Se utilizó tanto el número de haces como el grosor de las hojas.

$$Tasa\ de\ incremento\ diaria = \frac{\left(\frac{valor\ final \times 100}{valor\ inicial - 100}\right)}{n^{\circ}\ de\ días}$$

Siendo valor: n° de haces y grosor (mm); inicial: medido antes de introducirlo en el acuario; final: medido al extraerlo del acuario a los 10-12 días.

B. Mortalidad de plantas

La tasa de mortalidad de las plantas se obtiene a través de la pérdida de biomasa de hojas y haces muertos recogidos periódicamente de cada acuario entre los días transcurridos siguiendo la fórmula:

$$Tasa\ pérdida\ de\ biomasa = \frac{\sum peso\ hojas\ caídas}{n^{\circ}\ de\ días}$$

C. Análisis del estado fisiológico de las plantas

Se recogieron muestras de la biomasa aérea y subterránea de los 3 tratamientos tanto al final del periodo experimental como de las plantas plantados a lo largo del mismo, para medir los niveles de azúcares (sacarosa y almidón). Con esto se pretende determinar los efectos fisiológicos del agua desechada por los cultivos de dorada producidos en las praderas de *Z. noltei*.

Estas muestras se analizaron siguiendo el protocolo de Yemm & Willis (1954) modificado y ampliado por Patricia García en octubre de 2010, que es explicado a continuación:

Para realizar la extracción de azúcares primero se liofilizaron y trituraron las muestras. Posteriormente se añadió EtOH al 96%, y tras calentar y centrifugar se obtuvo un precipitado y un sobrenadante.

Por un lado, al sobrenadante se añadió de nuevo EtOH y se repitió el proceso de extracción cinco veces. Los sobrenadantes se dejaron evaporar con la ayuda de aireación para conseguir un residuo seco, que se disolvió en agua para poder medir sacarosa. Para la medición de la concentración de sacarosa, se prepararon patrones a partir de una concentración conocida y el reactivo resorcinol con EtOH. El reactivo se añadió a la muestra junto con HCl concentrado (1N). Una vez agitado y calentado se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 486 nm.

Por otro lado, al precipitado se le añadió NaOH 0,1 N, se agitó y se dejó reposar para la medición de almidón. Para su medición se prepararon patrones y el reactivo antrona, que se añadió a la muestra para su cuantificación. Una vez calentado se midió la absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm.

D. Biodiversidad de la comunidad

De las 3 muestras iniciales de 400 cm² de la pradera de *Z. noltei* (pool inicial) se contabilizaron y clasificaron los organismos presentes. Este mismo procedimiento se realizó en los acuarios tras su desmantelamiento para analizar las diferencias producidas en la biodiversidad por los distintos tratamientos.

Los organismos para su posterior identificación y análisis fueron introducidos en una solución de rosa de bengala y de alcohol al 70%. En las tareas de identificación de ejemplares se intentó llegar siempre al taxón más bajo posible. Los organismos

posteriormente se clasificaron con ayuda de una lupa y por medio del uso de distintas claves de identificación y guías monográficas y/o artículos (Campbell, 1979; Riedl, 1986; Koutsoubas et al., 2000).

A partir de los datos de abundancia, se obtuvieron las abundancias relativas de cada especie para cada tratamiento, dividiendo la abundancia de una especie entre la suma de todos los organismos encontrados en ese tratamiento. Además, se calcularon los siguientes índices para cada tratamiento: Índice de Shannon-Weaver para la diversidad, Índice de Simpson para la dominancia de especies e Índice de Margalef para la riqueza.

$$\text{Índice de Shannon} \rightarrow H = - \sum_{i=1}^s p_i * \log_2(p_i) , p_i = \frac{n_i}{N}$$

$$\text{Índice de Simpson} \rightarrow D = \frac{\sum n_i * (n_i - 1)}{N * (N - 1)}$$

$$\text{Índice de Margalef} \rightarrow D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln N}$$

2.4. Análisis de datos y estadístico

Para determinar diferencias significativas entre los dos tratamientos, A y C, se realizó el test de T Student en el caso de cumplirse normalidad y homocedasticidad. En los supuestos de datos no paramétricos se aplicó el test de Wilcoxon.

Cuando se estudiaron 3 grupos, (A, B y C, o A, C, y control) se realizó el test paramétrico ANOVA de 1 factor en todos los casos en los que se cumpliera normalidad y homocedasticidad. En el caso en el que no se cumplieron las condiciones se realizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Para los casos de diferencias significativas entre grupos se aplicó el test de Tukey para el caso de ANOVA de 1 factor o el test de Dunn para el caso de Kruskal-Wallis, para identificarlos. Las diferencias en función del tratamiento y de la semana (análisis de agua), y en función del tratamiento y de la biomasa de *Zostera noltei* (aérea o subterránea), se estudió usando ANOVA de 2 factores. Si se daban diferencias significativas entre grupos, se aplicó el test de Bonferroni para identificarlos.

Las diferencias estadísticamente significativas fueron aceptadas con un nivel de significación (α) de 0,05. Todos los resultados se expresan como la media del valor de la variable \pm error estándar de la media (ESM) y fueron realizados con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Cultivo de peces con diferente frecuencia de alimentación

3.1.1. Parámetros biométricos y nutricionales

El tratamiento A presentó un peso medio mayor al de los otros 2 tratamientos en los 5 muestreos realizados. En los 79 días de periodo experimental los tres tratamientos han tenido la misma tendencia de crecimiento hasta el muestreo 3, donde el tratamiento C mostró un leve aumento en la pendiente de crecimiento, tanto en longitud como en peso, lo que le hizo obtener un mayor incremento medio (+5%) respecto a la media de los otros dos tratamientos.

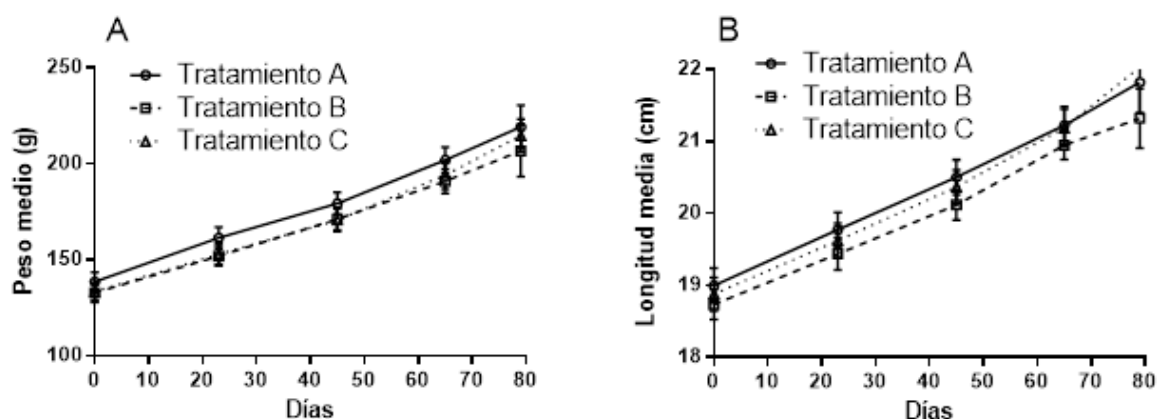


Figura 11. Peso medio (A) y longitud media (B) de los ejemplares de *Sparus aurata* tras la utilización de 3 diferentes frecuencias de alimentación (Trat A = 1 toma diaria; Trat B = 2 tomas diarias; Trat C = 3 tomas diarias) durante 79 días. Todos los valores son expresados como media \pm E.S.M. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento A y los otros 2 tratamientos (ANOVA de 1 factor seguido de un test de Tukey, $P < 0,05$).

Los índices biométricos y nutricionales (Tabla 2) corroboran la gran similitud existente en el crecimiento para los tres tratamientos, tanto en longitud furcal como en peso. La similitud también está presente en la ganancia de peso (WG), en la tasa específica de crecimiento (SGR) y en el factor de conversión del alimento (FCR). El factor de condición de Fulton (K) presentó diferencias significativas entre el tratamiento A y C, siendo superior en el tratamiento A al final del periodo experimental.

Tabla 2. Parámetros biométricos de longitud furcal (cm), peso (g) y parámetros nutricionales: factor de condición de Fulton (K), ganancia de peso (WG), tasa específica de crecimiento (SGR), factor de conversión del alimento (FCR) y tasa de alimentación específica (SFR), de ejemplares de *Sparus aurata* a tiempo inicial y tras 79 días de experimentación. Todos los valores son expresados como media \pm E.S.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos.

Parámetro	Tiempo	Tratamientos		
		A	B	C
Longitud (cm)	Inicial	19,0 \pm 0,2	18,7 \pm 0,2	18,9 \pm 0,2
	Final	21,2 \pm 0,3	20,9 \pm 0,2	21,2 \pm 0,3
Peso (g)	Inicial	138,7 \pm 4,9	132,9 \pm 4,9	133,5 \pm 4,7
	Final	202,1 \pm 6,7	191,0 \pm 6,4	194,1 \pm 7,1
K	Inicial	2,00 \pm 0,02	2,00 \pm 0,03	1,96 \pm 0,02
	Final	2,10 \pm 0,03 ^a	2,06 \pm 0,03 ^{ab}	2,00 \pm 0,02 ^b
WG (%)	Final	58,1	55,6	60,8
SGR (% día ⁻¹)	Final	0,6	0,6	0,6
FCR (g)	Final	26,6	27,0	25,5
SFR (% día ⁻¹)	Final	15,6	15,3	15,5

3.1.2. Parámetros plasmáticos

Los valores de glucosa fueron significativamente superiores para el tratamiento C (Figura 12A). Los niveles de TAG también mostraron diferencias significativas entre tratamientos, siendo superior en el tratamiento A (Figura 12B). El lactato fue ligeramente superior en el tratamiento B (15% mayor a la media de los otros dos tratamientos) pero sin diferencias significativas. (Figura 12C). Por último, la concentración de proteínas no se vio modificada en ninguno de los tratamientos (Figura 12D).

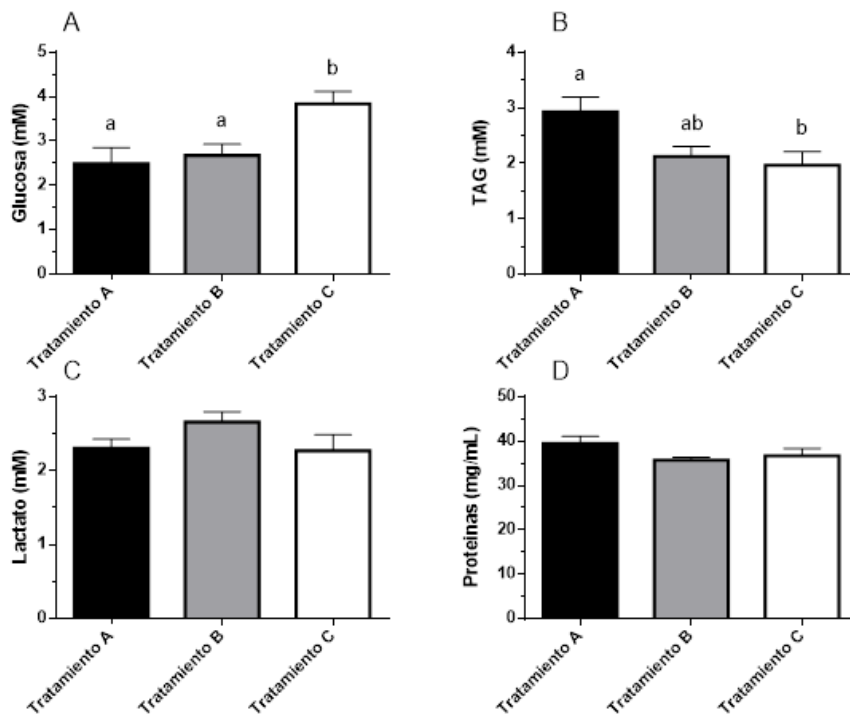


Figura 12. Glucosa (A), triglicéridos (B), lactato (C) y proteínas (D) analizados en el plasma sanguíneo de los ejemplares de *Sparus aurata* tras la utilización de 3 diferentes frecuencias de alimentación (Trat A = 1 dosis diaria; Trat B = 2 dosis diarias; Trat C = 3 dosis diarias) durante 79 días. Todos los valores son expresados como media \pm E.S.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos (ANOVA de 1 factor seguido de un test de Tukey, $P < 0,05$).

3.1.3. Parámetros hepáticos

El índice hepatosomático no presentó diferencias significativas entre los 3 tratamientos, aunque el tratamiento A presentó un incremento del 10% respecto a la media de los otros dos tratamientos (Figura 13).

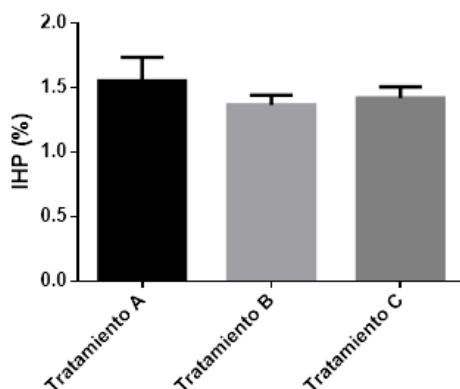


Figura 13. Índice hepatosomático (IHS) de los ejemplares de *Sparus aurata* durante 79 días de periodo experimental. Todos los valores son expresados como media \pm E.S.M. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA de 1 factor seguido de un test de Tukey, $P < 0,05$).

Se obtuvieron diferencias significativas en los valores de glucosa hepática (Figura 14A), apreciándose valores significativamente superiores para el tratamiento C. Los niveles de glucógeno hepático también mostraron diferencias significativas entre tratamientos, siendo en este caso superior en el tratamiento A (Figura 14B). Los triglicéridos (TAG) no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, aunque si se observó en el tratamiento C un incremento entorno al 10% respecto a la media de los otros dos tratamientos (Figura 14C).

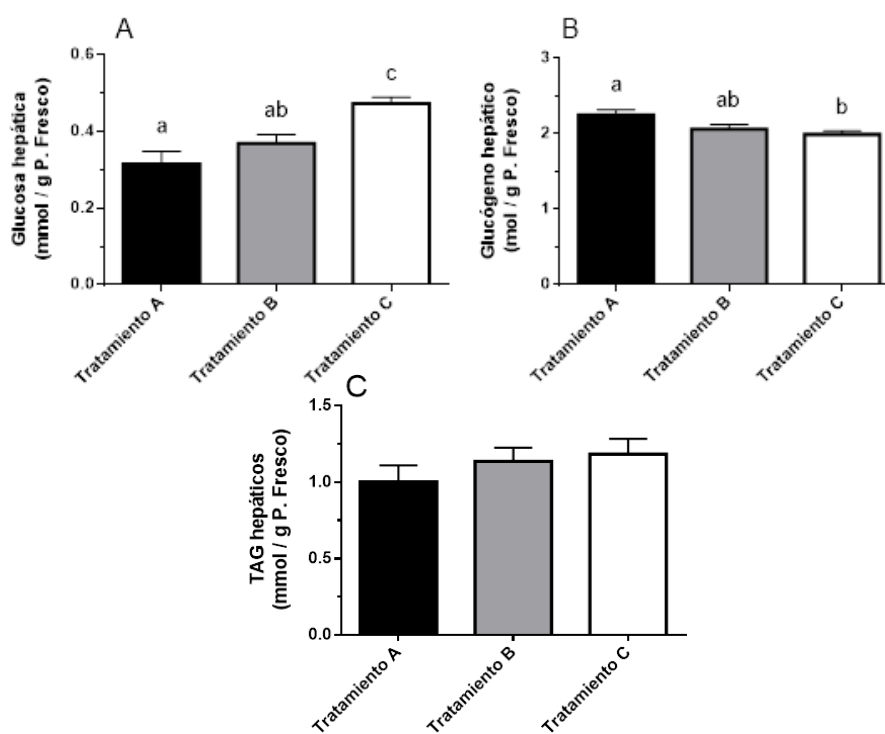


Figura 14. Glucosa hepática (A), glucógeno hepático (B) y triglicéridos hepáticos (C) analizados en el hígado de los ejemplares de *Sparus aurata* tras la utilización de 3 diferentes frecuencias de alimentación (Trat A = 1 dosis diaria; Trat B = 2 dosis diarias; Trat C = 3 dosis diarias) durante 79 días. Todos los valores son expresados como media \pm E.S.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos (ANOVA de 1 factor seguido de un test de Tukey, $P < 0,05$).

3.2. Análisis del agua

3.2.1. Concentración de nutrientes y MO en los tanques de dorada a lo largo del día

Los nutrientes analizados (amonio, nitrato, nitrito y fosfato) en los tanques de dorada mostraron diferencias significativas entre el tratamiento A y C, presentando el tratamiento A valores significativamente más altos en la concentración de amonio, nitrito y fosfato durante todo el periodo de muestreo. Por su parte, el tratamiento C mostró valores significativamente más altos en la concentración de nitrato.

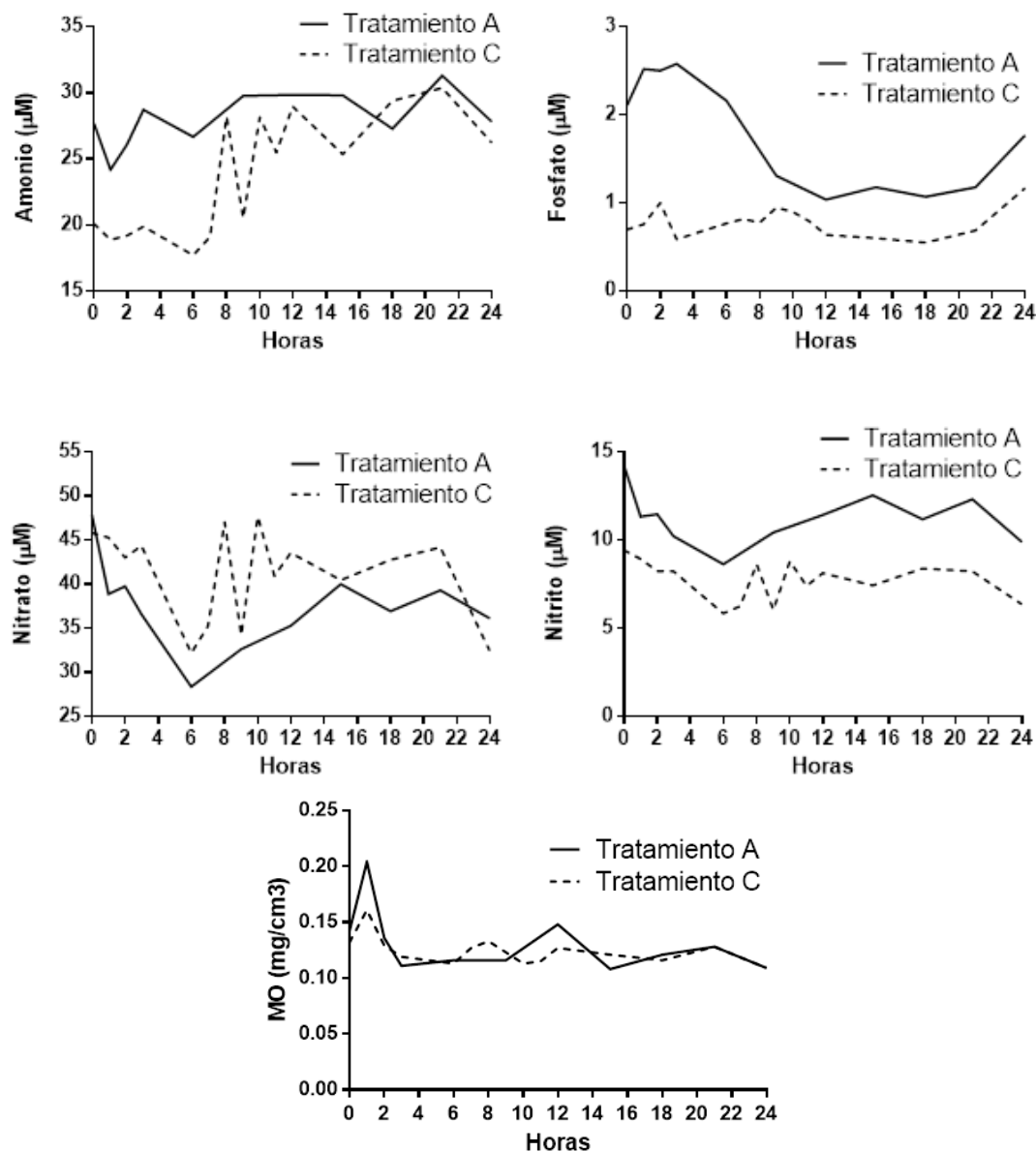


Figura 15. Análisis de Nutrientes y MO en tanques con ejemplares de *S. aurata* aclimatados a diferentes frecuencias de alimentación (Trat A = 1 dosis diaria; Trat C = 3 dosis diarias) durante 24 horas seguidas. (T Student / Wilcoxon, $P < 0,05$).

3.2.2. Concentración de nutrientes y MO a la salida de los tanques de dorada y en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas

Respecto a la concentración de nutrientes en el agua, la concentración de amonio (NH_4^+) fue significativamente superior en ambos tratamientos respecto al control (Figura 17A).

En las comunidades de angiospermas marinas, el tratamiento A presentó concentraciones significativamente mayores de amonio respecto al control a las 24 horas y especialmente a las 72 horas desde la renovación del agua en todo el periodo experimental, aumentando las diferencias con el paso de las semanas. En cambio, el tratamiento C fue

significativamente superior respecto al control en la semana 4, a las 24 horas y a las 72 horas desde la renovación del agua. Entre tratamientos (A y C) existieron diferencias significativas en la semana 3 tanto a las 24 horas desde la renovación del agua como a las 72 horas, siendo la concentración del tratamiento A mayor.

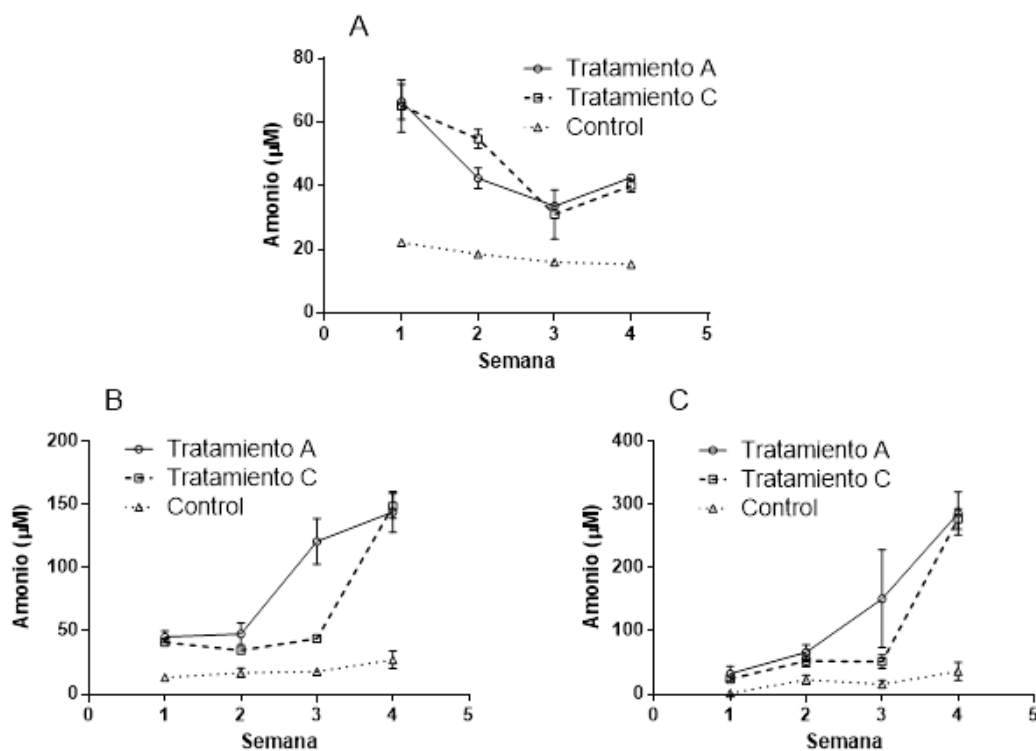


Figura 16. Análisis del amonio en el agua procedente de los tanques de dorada con diferente frecuencia de alimentación antes de ser usada para la renovación de agua en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas (Trat A = 1 dosis diaria; Trat C = 3 dosis diarias; Control = agua procedente del acuífero subterráneo) (A), en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas tras 24 horas (B) y tras 72 horas desde la renovación del agua (C) durante las 4 semanas de periodo experimental. Los datos son expresados como media \pm E.S.M. (ANOVA de 2 factores seguido de un test de Bonferroni, $P < 0,05$).

La concentración de nitrito (NO_2^-) a la salida de los tanques de dorada ha sido significativamente superior en ambos tratamientos respecto al control en las semanas 1, 2 y 4, siendo el tratamiento A también significativamente mayor en la semana 3 respecto al control (Figura 17A).

En las comunidades de angiospermas marinas, solo existieron diferencias significativas en la semana 4 a las 72 horas desde la renovación del agua, siendo significativamente mayores las concentraciones de ambos tratamientos respecto al control (Figura 17C).

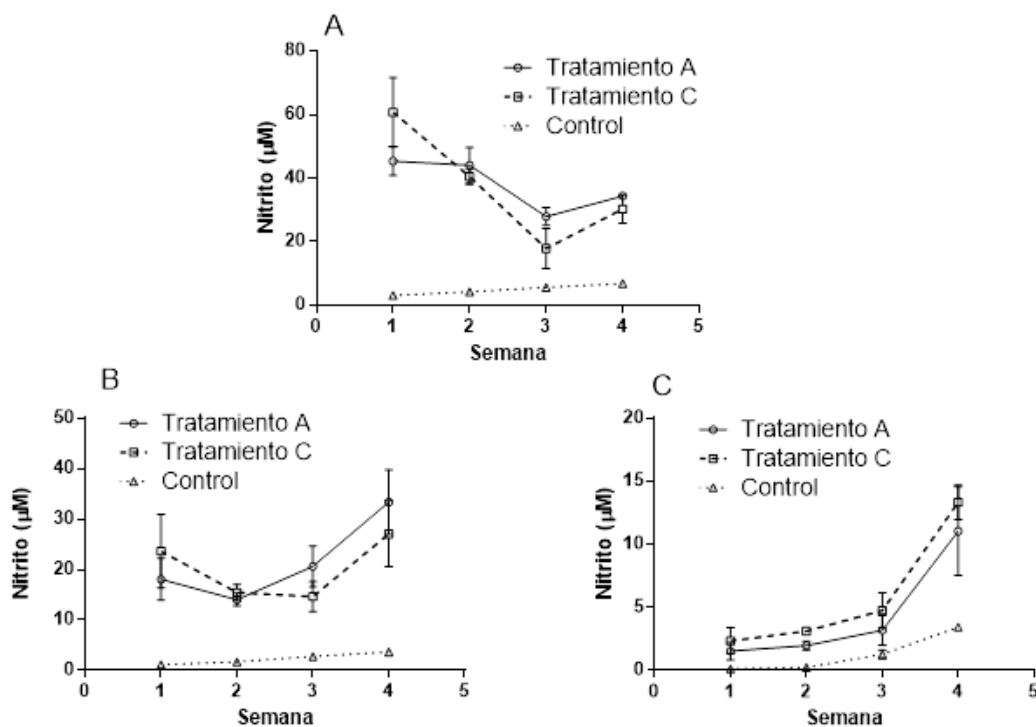


Figura 17. Análisis del nitrito en el agua procedente de los tanques de dorada con diferente frecuencia de alimentación antes de ser usada para la renovación de agua en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas (Trat A = 1 dosis diaria; Trat C = 3 dosis diarias; Control = agua procedente del acuífero subterráneo) (A), en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas tras 24 horas (B) y tras 72 horas desde la renovación del agua(C) durante las 4 semanas de periodo experimental. Los datos son expresados como media \pm E.S.M. (ANOVA de 2 factores seguido de un test de Bonferroni, $P < 0,05$).

A la salida de los tanques de dorada la concentración de nitrato (NO_3) fue significativamente mayor en ambos tratamientos respecto al control en todo el periodo experimental (Figura 18A).

En las comunidades de angiospermas marinas, a las 24 horas desde la renovación del agua, ambos tratamientos presentaron valores significativamente superior al control en las semanas 3 y 4, existiendo estas diferencias significativas a las 72 horas solamente en la semana 4 (Figura 18B, C).

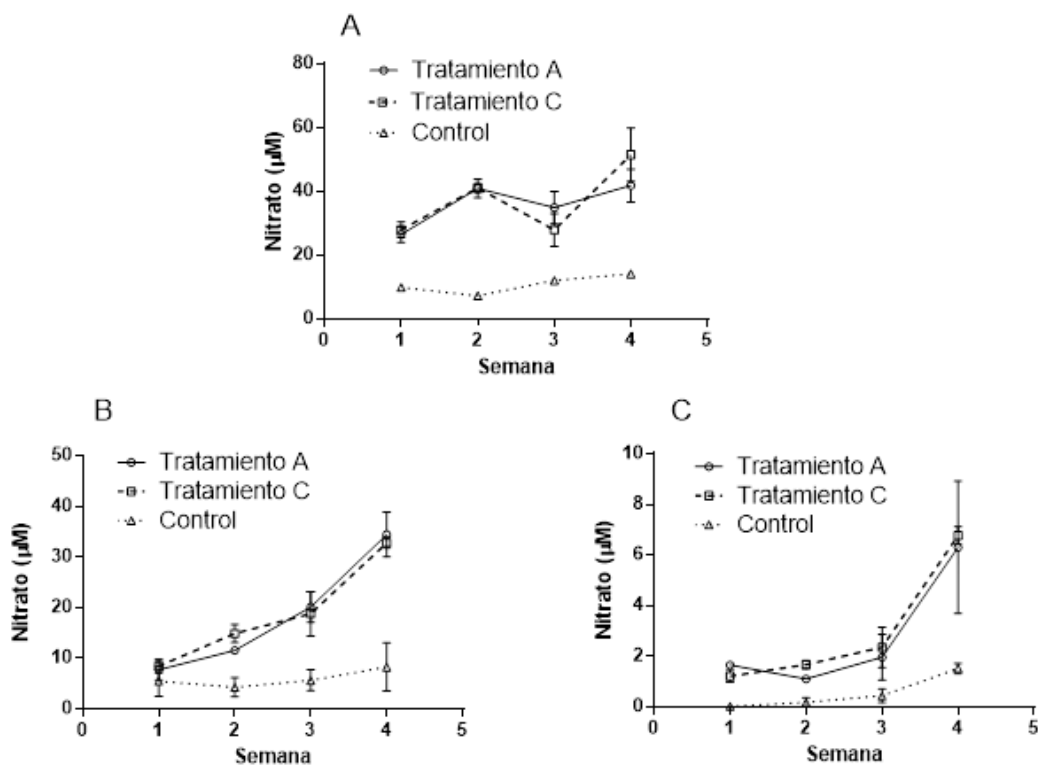
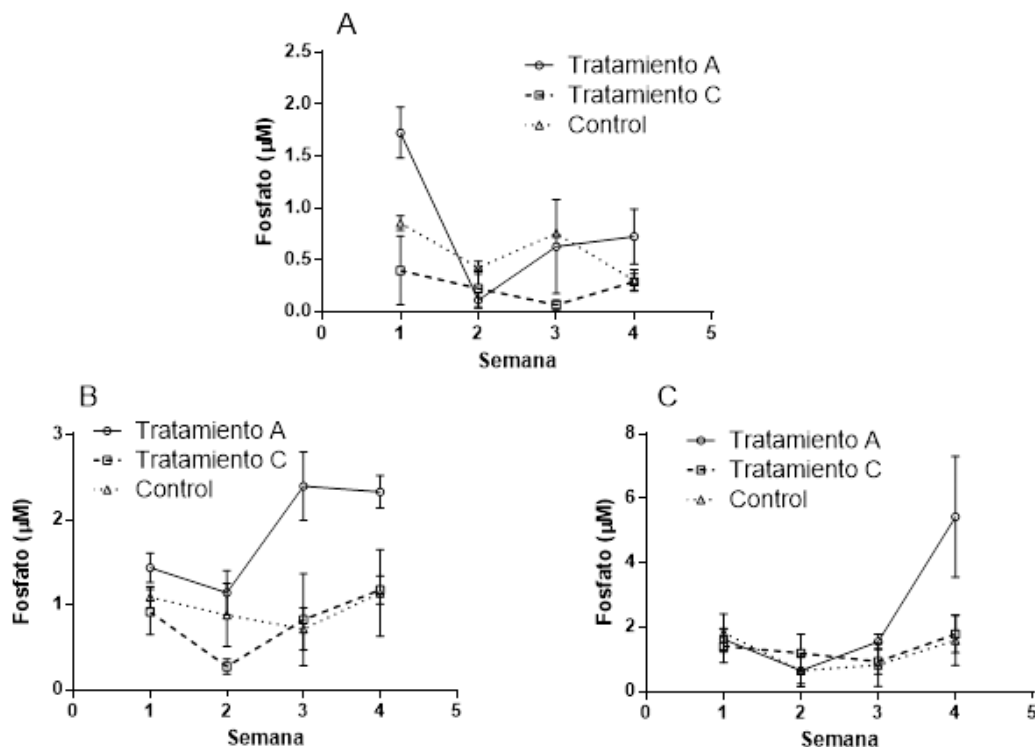


Figura 18. Análisis del nitrato en el agua procedente de los tanques de dorada con diferente frecuencia de alimentación antes de ser usada para la renovación de agua en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas (Trat A = 1 dosis diaria; Trat C = 3 dosis diarias; Control = agua procedente del acuífero subterráneo) (A), en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas tras 24 horas (B) y tras 72 horas desde la renovación del agua (C) durante las 4 semanas de periodo experimental. Los datos son expresados como media \pm E.S.M. (ANOVA de 2 factores seguido de un test de Bonferroni, $P < 0,05$).

En la concentración de fosfato (PO_4^{3-}) a la salida de los tanques de dorada, el tratamiento A fue significativamente mayor tanto al tratamiento C como al control en la semana 1 (Figura 19A).

En las comunidades de angiospermas marinas, el tratamiento A, a las 24 horas desde la renovación del agua, presentó valores significativamente superiores en las semanas 3 y 4 tanto con el tratamiento C como con el control (Figura 19B). A las 72 horas desde la renovación del agua, el tratamiento A fue significativamente mayor respecto al tratamiento C y el control en la semana 4 (Figura 19C).



La concentración de MO en el agua no presentó diferencias significativas entre tratamientos (Figura 20). La concentración de la MO a lo largo de las 4 semanas del periodo experimental es similar tanto a la salida de los tanques de dorada (Figura 20A) como tras 24 horas desde la renovación del agua en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas (Figura 20B), siendo la concentración máxima en la semana 2.

Sin embargo, tras pasar 72 horas desde la renovación del agua en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas la MO cambia, siendo superior tanto en la semana 1 y 4 (Figura 20C).

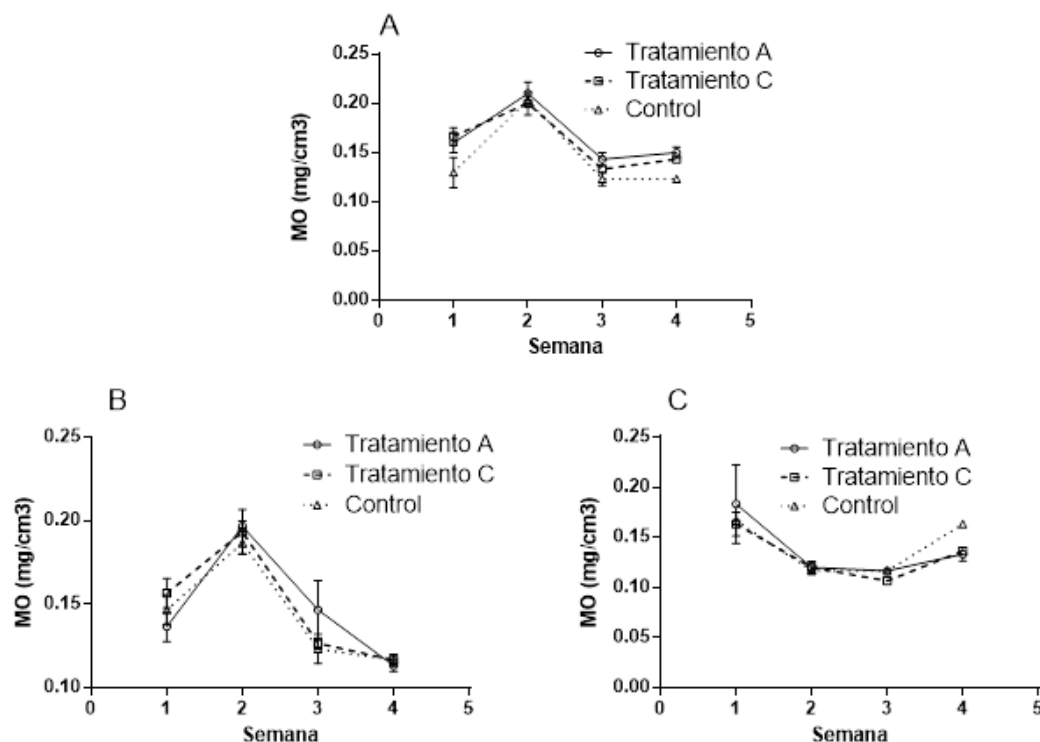


Figura 20. Análisis de la MO en el agua procedente de los tanques de dorada con diferente frecuencia de alimentación antes de ser usada para la renovación de agua en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas (Trat A = 1 dosis diaria; Trat C = 3 dosis diarias; Control = agua procedente del acuífero subterráneo) (A), en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas tras 24 horas (B) y tras 72 horas desde la renovación del agua (C) durante las 4 semanas de periodo experimental. Los datos son expresados como media \pm E.S.M. (ANOVA de 2 factores seguido de un test de Bonferroni, $P < 0,05$).

3.3. Cultivo de praderas de angiospermas marinas con agua procedente del cultivo de peces

3.3.1. Morfología y crecimiento de plantas

Las praderas sometidas a aguas procedentes del cultivo de dorada con diferentes frecuencias de alimentación (tratamiento A y C) mostraron una densidad de haces similar al finalizar el periodo experimental pero significativamente menor respecto al control (Figura 21A). No obstante, el tratamiento C presentó una disminución del 50% respecto al tratamiento A, aunque sin diferencias significativas.

La longitud media de las hojas en ambos tratamientos es la mitad que la del control, siendo estas diferencias significativas. Existen diferencias también entre tratamientos, aunque no significativas, siendo la longitud media del tratamiento C un 15% menor al tratamiento A (Figura 21B).

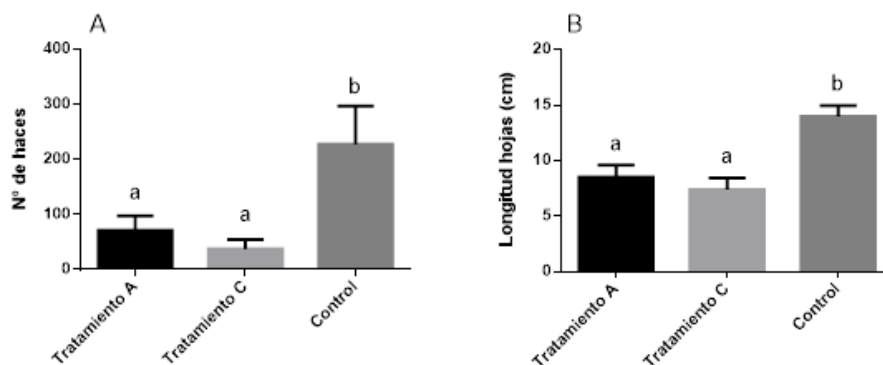


Figura 21. Número de haces (A) y longitud de las hojas (B) medidos en los acuarios de comunidades de *Z. noltei* tras su desmantelamiento. Los datos son expresados como media \pm E.S.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos (ANOVA de 1 factor seguido de un test de Tukey, $P < 0,05$).

Respecto al tipo de haces, el tratamiento A presentó una disminución en el porcentaje de haces apicales respecto al control, mientras que el tratamiento C alcanzó un porcentaje de haces apicales muy cercano al mismo (Figura 22).

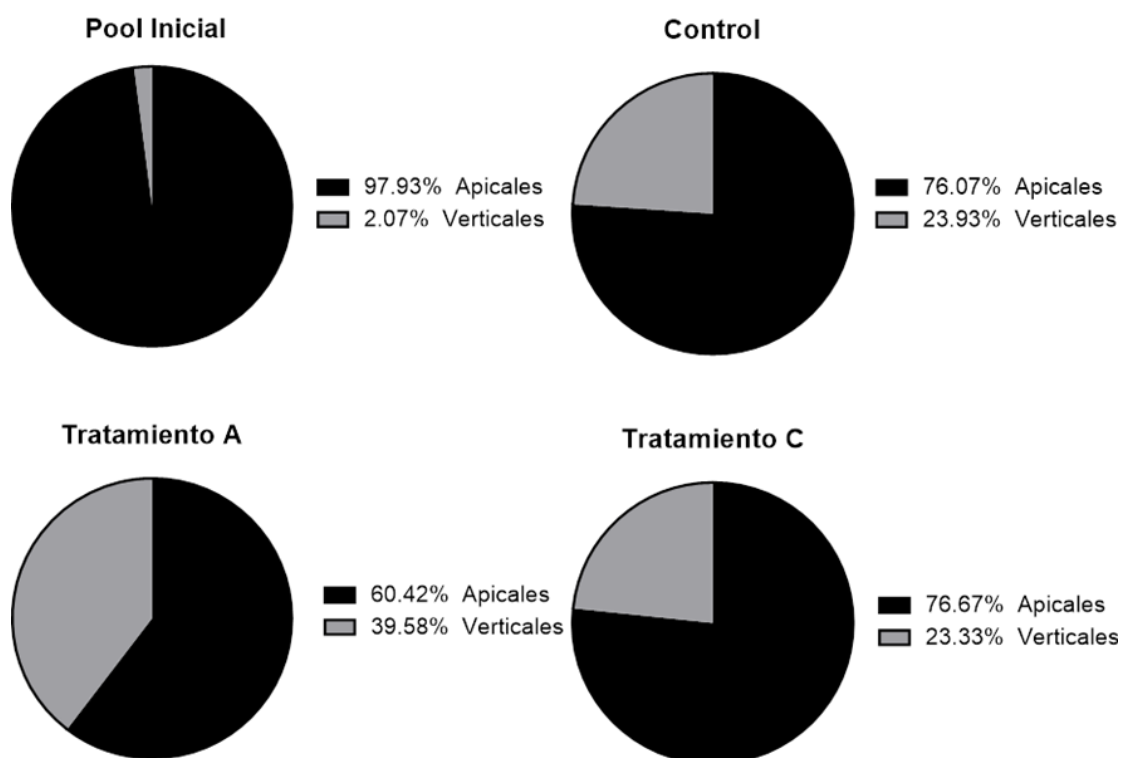


Figura 22. Diagrama de sectores de la proporción del tipo de haz tanto en el muestreo inicial de la pradera localizada en la zona intermareal de Santibáñez (36.47N 6.25W) como en el desmantelamiento de los acuarios de comunidades de angiospermas marinas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA de 1 factor seguido de un test de Tukey, $P < 0,05$).

En cuanto a los resultados de crecimiento en las plantas procedentes del medio natural, el tratamiento A semanalmente varió su tasa de incremento de haces de positiva a negativa mientras que el tratamiento C siempre mantuvo una tasa de incremento de haces negativa (Figura 23A). En todo el periodo experimental, el tratamiento A incrementó el número de haces, mientras que el tratamiento C disminuyó un 75% más respecto al control, que también mostró una tasa de incremento en el número de haces negativa (Figura 23B).

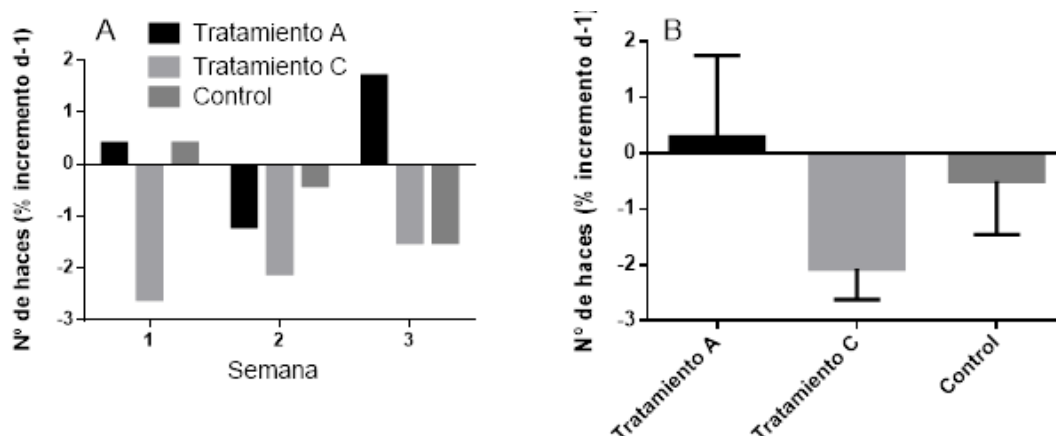


Figura 23. Tasa de incremento diario del número de haces en plantas procedentes del medio natural cada semana (A) y de todo el periodo experimental en su conjunto (B). Los datos son expresados en porcentajes, representándose en la Figura B como media \pm E.S.M.

En cuanto a la tasa de incremento diario del grosor de las hojas, el tratamiento A mantuvo una tasa de incremento de grosor de hojas negativa en todo el periodo experimental. El tratamiento C, aunque con una tasa de incremento positiva, al final del periodo experimental también obtuvo una tasa de incremento de grosor de hojas negativa (Figura 24A, B).

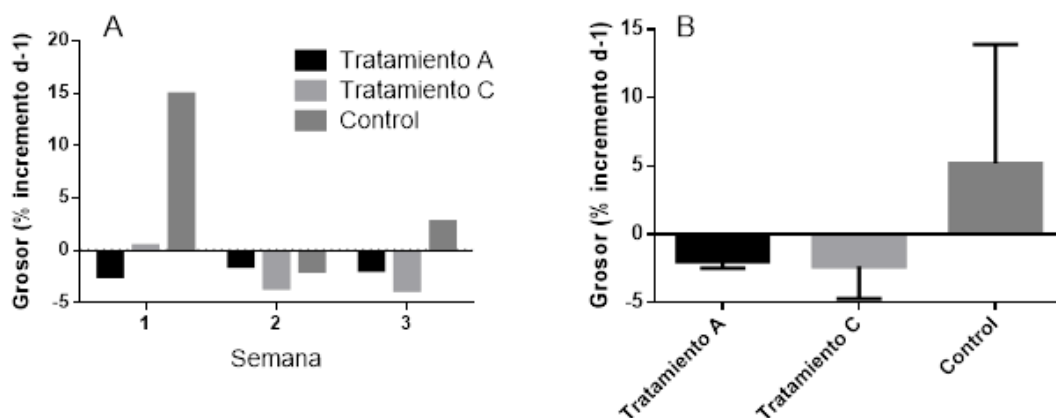


Figura 24. Tasa de incremento diario del grosor (mm) cada semana (A) y de todo el periodo experimental en conjunto (B) medidos en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas. Los datos son expresados en porcentajes, representándose en la Figura B como media \pm E.S.M.

3.3.2. Pérdida de hojas y haces

El tratamiento A y C han seguido una tendencia creciente en la cantidad de hojas muertas recogidas a lo largo de todo el periodo experimental (Figura 25A). Existen diferencias significativas en las hojas muertas recogidas entre ambos tratamientos y el control, teniendo el tratamiento A un incremento entorno al 10% respecto al tratamiento C al final del periodo experimental (Figura 25B). El tratamiento A es el que tiene una mortalidad diaria mayor, siendo también superior entorno al 10% respecto al tratamiento C (Figura 25C).

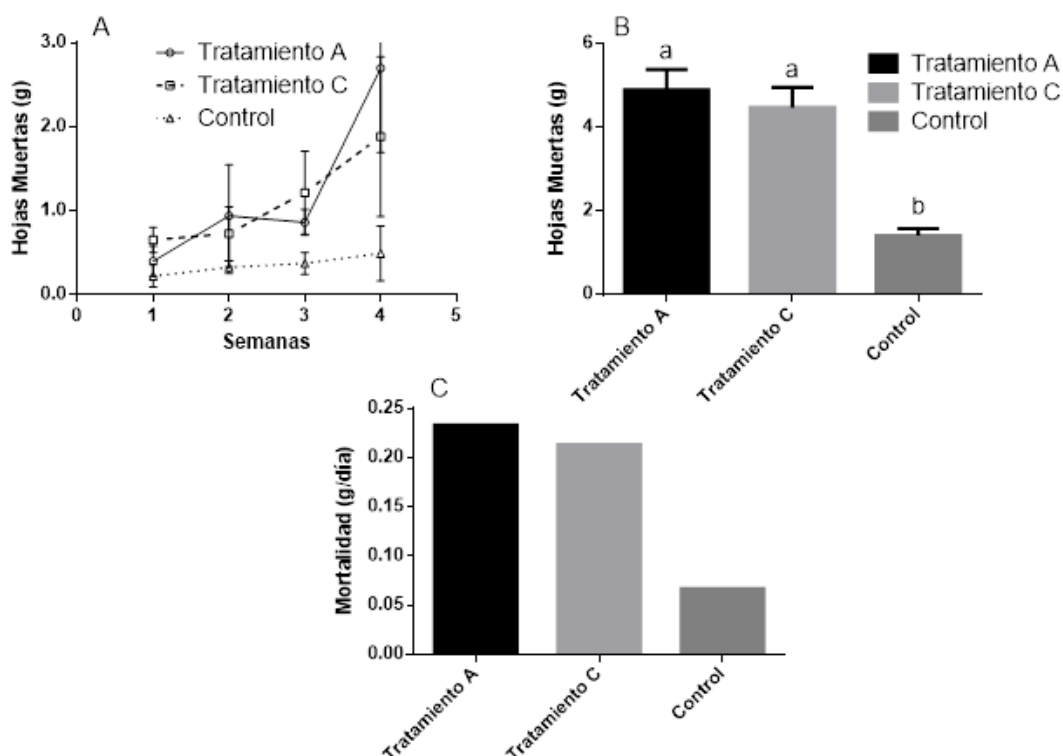


Figura 25. Hojas muertas (g de peso fresco) recogidas cada semana (A), durante todo el periodo experimental (B) y la mortalidad diaria (g/día) (C) medidos en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas. Los datos son expresados como media \pm E.S.M (A y B). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos (ANOVA de 1 factor seguido de un test de Tukey, $P < 0,05$).

3.3.3. Análisis del estado fisiológico de las plantas

En el análisis de sacarosa no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento A y C en la parte aérea, pero ambos fueron significativamente menores al control. En la parte subterránea no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 26A).

En el almidón se encontraron diferencias significativas tanto en la parte aérea como en la subterránea. En la parte aérea, se encontró una pérdida de almidón en el tratamiento C y

especialmente en el tratamiento A respecto al control. En la parte subterránea, también hubo una disminución de almidón respecto al control que fue significativa en el tratamiento C (Figura 26B).

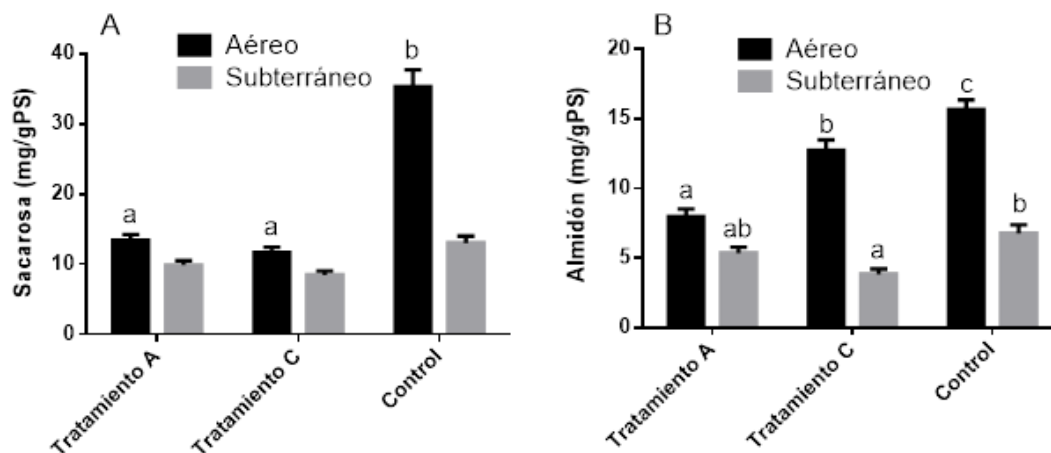


Figura 26. Sacarosa (mg/g PS de muestra) (A) y almidón (B) medidos en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas tras su desmantelamiento. Los datos son expresados como media \pm E.S.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos (ANOVA de 2 factores seguido de un test de Bonferroni, $P < 0,05$).

3.3.4. Biodiversidad de la comunidad

En los tres índices de biodiversidad (Shannon, Simpson y Margalef) analizados el tratamiento C presentó valores similares de biodiversidad respecto al pool inicial de la pradera natural y el control. Sin embargo, el tratamiento A presentó una disminución de biodiversidad que fue significativa en el caso del índice de Margalef (Figura 27C).

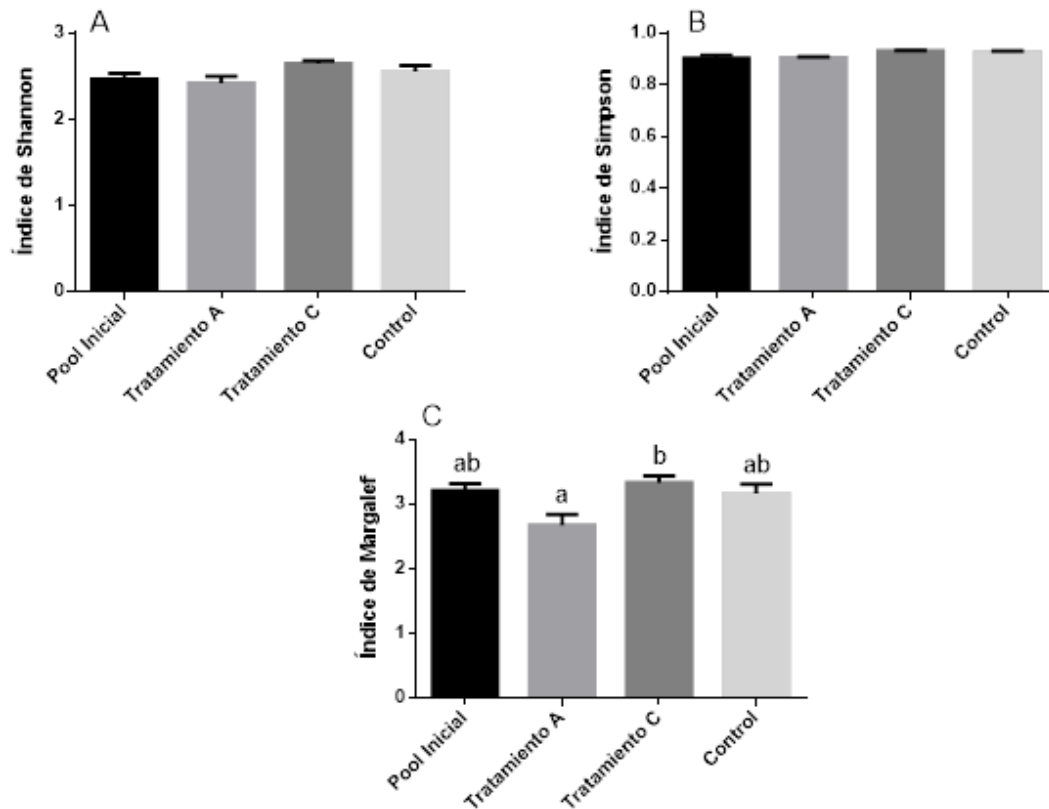


Figura 27. Índice de diversidad de Shannon (A), Índice de dominancia de especies de Simpson (B) e Índice de riqueza de Margalef (C) calculados a partir de los datos de abundancia de fauna del pool inicial de la pradera natural y de los acuarios de comunidades de angiospermas marinas (Tratamiento A, Tratamiento C y Control). Los datos son expresados como media \pm E.S.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos (ANOVA de 1 factores seguido de un test de Tukey, $P < 0,05$).

Tanto en el pool inicial de la pradera natural como al final de los 3 tratamientos seguidos (tratamiento A, tratamiento C y control) predominan los moluscos-gasterópodos. En el control se han mantenido las proporciones de los diferentes taxones, aunque hay que resaltar la bajada de los crustáceos-isópodos y el aumento de los moluscos-poliplacóforos y de los anélidos-poliquetos.

En los tratamientos A y C se ha visto una variación mayor de las proporciones. Los predominantes seguían siendo moluscos-gasterópodos, aunque han perdido proporción. En ambos tratamientos han desaparecido los crustáceos isópodos y braquiuros, y se han encontrado otra variedad de crustáceos no presentes en el pool inicial, los gammaridae. La mayor diferencia encontrada entre ambos tratamientos se da en la proporción de moluscos-bivalvos que, aunque ha aumentado en ambos, el aumento ha sido mayor en el tratamiento C.

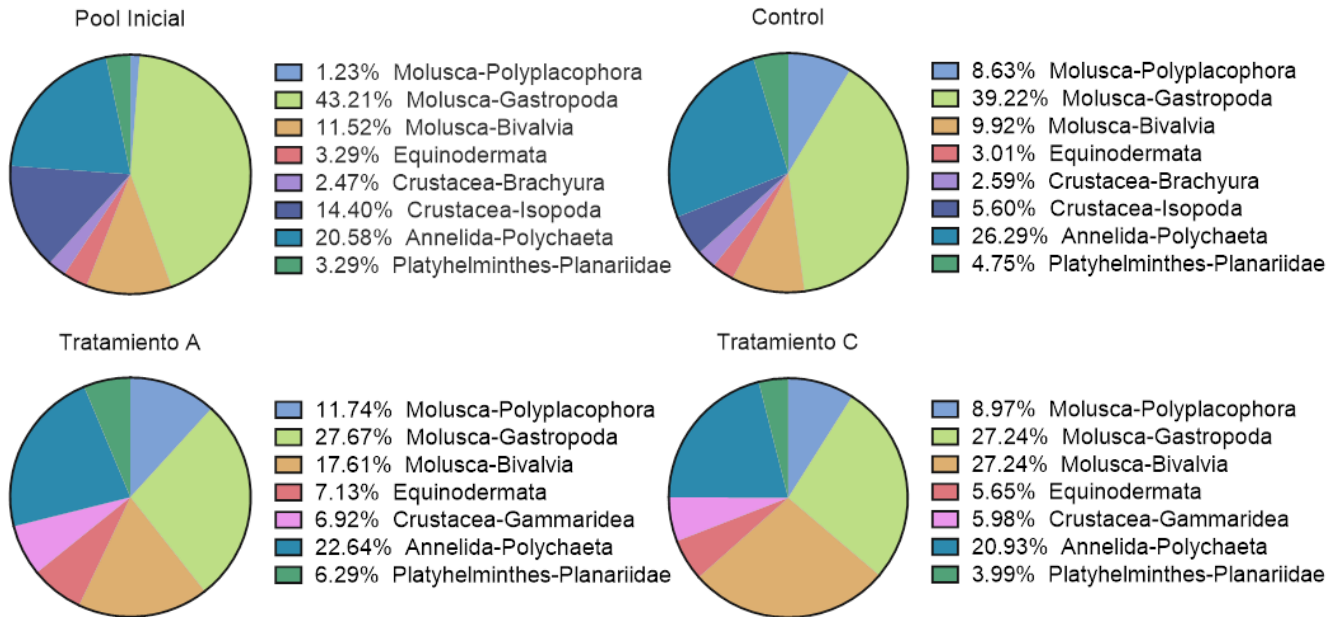


Figura 28. Diagrama de sectores de la abundancia de taxones tanto en el pool inicial de la pradera natural como en los acuarios de comunidades de angiospermas marinas (Tratamiento A, Tratamiento C y Control).

4. DISCUSIÓN

4.1. Cultivo de peces con diferente frecuencia de alimentación

La frecuencia de alimentación es un importante factor en la práctica acuícola, pues su optimización induce una mejora en el crecimiento de los peces cultivados, optimización del uso de los alimentos suministrados y una disminución en las sustancias de desechos de los efluentes de la instalación acuícola (Jobling, 1981; Salama, 2008; Messina et al., 2014; Sun et al., 2016; Yúfera et al., 2018).

En un experimento previo con alevines de dorada sometidos a diferentes frecuencias de alimentación (Yúfera et al., 2014) se demostró que un mayor reparto de las dosis de alimento origina un mayor crecimiento, posiblemente por una mejor digestión y asimilación del alimento. Sin embargo, en nuestro experimento, con una duración de 79 días, no se han observado diferencias significativas de crecimiento entre las diferentes frecuencias de alimentación. La discrepancia entre los resultados obtenidos por Yúfera y colaboradores y nuestros resultados podría ser debida a la diferencia en el peso de los ejemplares utilizados (alevines con un peso medio inicial de 1 g en el trabajo de Yúfera y colaboradores *versus* a juveniles, con un peso inicial de $135,1 \pm 26,2$ g, en nuestro caso) y a la diferencia en velocidad de crecimiento entre ambos.

Debemos destacar que los ejemplares de dorada sometidos al tratamiento C (alimentación con tres dosis diarias a las 9:00, 15:00 y 18:00 respectivamente, al 0,67 % del peso medio húmedo) presentan en las dos últimas semanas un aumento en la pendiente de crecimiento, tanto en longitud furcal como en peso. Estos resultados sugieren que, en el caso de los juveniles, se hace necesario un mayor tiempo de experimentación para poder ver diferencias significativas en peso debido a la frecuencia de alimentación.

Esta tendencia de crecimiento demuestra la hipótesis de partida sobre que “la frecuencia de alimentación afecta tanto al crecimiento como al metabolismo de los ejemplares de dorada”, informándonos sobre un posible aumento de crecimiento en las doradas alimentadas con una mayor frecuencia de alimentación. Esto se ha observado en diversas especies de teleósteos (*L. calcarifer*: Salama, 2008; *D. labrax*: Messina et al., 2014; *S. salar*: Sun et al., 2016) incluida *S. aurata* (Yúfera et al., 2014), donde se ha demostrado que un mayor reparto de las dosis de alimento posibilita una mejor digestión y asimilación de este, y por tanto un mayor crecimiento.

La influencia de la frecuencia de alimentación sobre el crecimiento de la dorada se refleja en el metabolismo interno, tanto a nivel plasmático como hepático. Estas modificaciones metabólicas se aprecian mayoritariamente en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, pero no así a nivel de metabolismo proteico ni de lactato (Figuras 12 y 14).

De este modo, las doradas alimentadas con tres dosis diarias (tratamiento C) mostraron valores superiores de glucosa en sangre (glucemia) respecto a las de una sola dosis diaria (tratamiento A), debido a la existencia de un suministro constante de energía (lo que se refleja en un mejor crecimiento, aunque no estadísticamente diferente). Esto también altera el metabolismo glucídico a nivel hepático, pues el tratamiento A originó una mayor concentración de glucógeno almacenado en el hígado. Estos resultados concuerdan con lo descrito anteriormente por Enes et al. (2015) en *Diplodus sargus*, quienes encontraron que la actividad de la hexoquinasa hepática (HK) (enzima encarga de fosforilar la glucosa en los hepatocitos con el objeto de que no salga de la célula, y paso previo para la formación de glucógeno) aumenta con la disminución de la frecuencia de alimentación. El gran pico post-ingesta de glucosa en sangre (originado por una gran cantidad de comida en una única toma) es el estímulo para la activación de la HK y, consecuentemente, la formación de glucógeno (Enes et al., 2015). Este hecho se corrobora con el menor valor de glucosa hepática observada en los ejemplares sometidos al tratamiento A.

Sin embargo, se aprecia como el tratamiento A altera el metabolismo lipídico con mayores valores de TAG a nivel plasmático y menores a nivel hepático. Estos resultados indican un menor aprovechamiento del alimento y una movilización de las reservas lipídicas para satisfacer sus necesidades energéticas, aumentando así su concentración en el plasma respecto al tratamiento A. Estos resultados en cuanto a los lípidos nos avisan sobre una posible disminución del estado general de bienestar de las doradas del tratamiento A. De este modo, las doradas de los diferentes tratamientos han sido alimentadas con la misma cantidad de comida (energía) a lo largo del día, pero en el tratamiento A, al ser suministrado toda la cantidad en un único momento, se han podido producir problemas de competencia por el alimento, que solo beneficia a los especímenes más grandes aumentando el sesgo en cuanto a tamaño y provocando problemas de estrés en los ejemplares de menor tamaño. Si la situación se mantiene, pueden darse respuestas terciarias a ese estrés provocando problemas de crecimiento, reproducción o del sistema inmunológico (Mancera, 2004).

4.2. Efectos del agua procedente del cultivo de peces en comunidades formadas por praderas de angiospermas marinas

La diferente frecuencia de alimentación utilizada en el cultivo de *S. aurata* produjo fluctuaciones diarias en la concentración de nutrientes en el agua efluente de su cultivo (figura 16) con, valores diarios significativamente mayores de amonio, nitrito y fosfato en el agua procedente del tratamiento A, demostrando la hipótesis planteada en este trabajo sobre que “diferentes frecuencias de alimentación podrían producir cambios en las condiciones fisicoquímicas del agua efluente de la actividad acuícola”. Estos cambios en el agua efluente tuvieron importantes consecuencias en las comunidades formadas por praderas de angiospermas marinas.

El agua procedente del cultivo de peces tuvo efectos negativos en las comunidades de angiospermas marinas en ambos tratamientos, tanto a nivel morfológico (menos longitud de hojas, Figura 21B), fisiológico (mayor mortalidad de plantas, Figura 25; menor contenido de azúcares, Figura 26) y de comunidad (menos biodiversidad, Figura 27). Estos resultados están en consonancia con estudios anteriores sobre el enriquecimiento de nutrientes del agua (eutrofización) en praderas de angiospermas marinas (Burkholder et al., 2007; Ruiz et al., 2015). Cabe destacar que la mayoría de los estudios anteriores realizaron el enriquecimiento de nutrientes mediante el uso de stocks artificiales ya preparados. Sin embargo, en este trabajo se lleva a cabo un enriquecimiento del agua derivado de un cultivo directo de peces. Por tanto, los resultados de este trabajo demuestran que la producción acuícola puede provocar indirectamente la degradación de ecosistemas costeros adyacentes a la actividad, como es el caso de las praderas de angiospermas marinas. Este hecho demuestra la hipótesis planteada inicialmente sobre “el esperado deterioro de la comunidad de *Zostera noltei* al someterse a los efluentes de agua de actividades acuícolas”.

Los resultados de este trabajo indican que el agua procedente del cultivo de peces con alta concentración de nutrientes llega a provocar toxicidad en las plantas, lo que hace que disminuya su crecimiento, densidad y biomasa y aumente la mortalidad de la pradera. Esta toxicidad puede considerarse un factor estresante, como ha sido demostrado anteriormente para angiospermas marinas (Van Katwijk et al., 1997; Brun et al., 2002, 2008; Invers et al., 2004), provocando la disminución en el contenido de azúcares encontrada en este trabajo (Figura 26). La concentración de azúcares en el experimento

estuvo dentro del rango normal para la especie estudiada en las latitudes templadas (Brun et al., 2002; Cabaço et al., 2007; Egea, 2012), sin embargo, la toxicidad del enriquecimiento en nutrientes produjo una disminución de estas reservas en ambos tratamientos, especialmente en el tratamiento A (1 dosis de alimentación diaria) y en los tejidos subterráneos (principal reservorio de carbohidratos; Hemminga & Duarte, 2000). Esto indica que aumentar la frecuencia de alimentación en los cultivos de peces puede atenuar en parte el efecto tóxico en las plantas, dado que el tratamiento C (3 dosis de alimentación diaria) mostró una pérdida de las reservas de azúcares algo menor. Este resultado es importante dado que las plantas con menos reservas de azúcares serán más sensibles al estrés derivado por otras perturbaciones ambientales como el incremento de temperatura, la disminución de la luz, etc. (Peralta et al., 2000; Brun et al., 2003; Olivé et al., 2007; Egea et al., 2018). La degradación de la pradera también provocó cambios en la composición y abundancia de la fauna asociada (Figura 29), probablemente como consecuencia del cambio en la concentración de nutrientes del agua como señalaron trabajos anteriores (Castejón-Silvo et al., 2012; Jiménez-Ramos et al., 2017; Egea et al., 2017). En este trabajo se encontró que el impacto del agua procedente de la actividad acuícola produjo un incremento en la comunidad de filtradores, que se benefició del incremento en la concentración de nutrientes en el agua, pero produjo la pérdida de otros grupos como los moluscos gasterópodos y los crustáceos isópodos, probablemente como consecuencia de la propia degradación del hábitat. Esto tiene importantes consecuencias, ya que la disminución de biodiversidad hace que el ecosistema sea menos resistente a otras perturbaciones, disminuyendo su capacidad de ofrecer funciones y servicios claves para la sociedad como el mantenimiento de las pesquerías (Unsworth et al., 2018).

Para llevar a cabo un desarrollo de la actividad acuícola sostenible, es necesario desarrollar técnicas que disminuyan el impacto de esta actividad en los ecosistemas costeros. Uno de los objetivos principales de este trabajo ha sido evaluar si cambios en la frecuencia de alimentación en el cultivo de peces afecta al “estado de conservación (crecimiento, producción y biodiversidad) de la comunidad de *Zostera noltei*”. Los resultados obtenidos en este trabajo nos sugieren que cambios en la frecuencia de alimentación en el cultivo de peces puede atenuar en cierta medida los efectos producidos por la actividad acuícola. Así, en las primeras semanas, ambos tratamientos consiguen soportar las elevadas cargas de nutrientes del medio (Figuras 16,17,18 y 19). Sin embargo, a lo largo del periodo experimental las concentraciones de amonio y fosfato en el agua se

incrementaron, especialmente en el tratamiento A. Esto indica que, aunque la comunidad puede ser resistente al impacto de la presión derivada de la actividad acuícola a corto plazo, cuando este impacto se prolonga en el tiempo la comunidad pierde su capacidad de absorber el exceso en la carga de nutrientes disminuyendo su resistencia. Estudios anteriores sobre enriquecimiento en nutrientes también encontraron incrementos en la concentración de nutrientes en el agua (ej. Egea et al., 2018) sugiriendo que este resultado es indicativo de la mayor vulnerabilidad de la comunidad a la toxicidad por altas concentraciones de nutrientes. Por su parte, el tratamiento C, además de tener un menor incremento en la concentración de nutrientes en el agua en las últimas semanas del experimento, presentó un mayor porcentaje de haces apicales, es decir, de nuevos haces de crecimiento y una menor pérdida de densidad (Figura 26B) (aunque sin diferencias significativas), y de azúcares (Figura 27), sobre todo en el almidón de la parte aérea. Por todo ello, el tratamiento sometido a aguas procedente del cultivo con 3 dosis de alimentación diaria (tratamiento C), parece ser un poco más resistente a la presión sometida por la actividad acuícola, al atenuarse los efectos negativos encontrados. Además, este tratamiento no mostró una pérdida de biodiversidad tan acusada como el tratamiento sometido al agua procedente del cultivo de una sola dosis de alimentación diaria (tratamiento A).

Las diferencias entre ambas dosis de alimentación estudiadas no han sido, en general, suficientes para contrastar la hipótesis inicial planteada sobre que “al aumentar la frecuencia de alimentación disminuirá el impacto de la actividad acuícola”. Sin embargo, las tendencias encontradas indican que al aumentar la frecuencia de alimentación de los cultivos se puede atenuar en parte el impacto sobre las praderas de angiospermas marinas. Dado que este ecosistema se encuentra entre los más amenazados del planeta por las actividades antrópicas, los hallazgos encontrados en este trabajo podrían resultar interesantes para futuros planes de gestión y conservación de estos hábitats. Por ello, este trabajo sirve de base para futuras investigaciones sobre el papel de la nutrición en acuicultura y sus consecuencias sobre los hábitats costeros.

5. CONCLUSIONES

1. Un aumento de la frecuencia de alimentación en el cultivo de la dorada (*Sparus aurata*) origina mejores modificaciones metabólicas que, a largo plazo, repercutirá en un mayor crecimiento.
2. Tres dosis de alimentación diarias producen valores superiores de glucemia, por la existencia de un suministro constante de energía; mientras que una dosis de alimentación induce un mayor almacenamiento de glucógeno hepático, ocasionado por el gran pico post-ingesta de glucosa en sangre tras la alimentación, y la movilización de las reservas lipídicas, originado por un menor aprovechamiento del alimento.
3. Cambiar la frecuencia de alimentación en los cultivos acuícolas modifica la concentración de nutrientes del agua efluente, siendo menor al incrementar el número de dosis de alimentación diaria.
4. La excesiva concentración de nutrientes en el agua efluente del cultivo acuícola provoca toxicidad en la comunidad dominada por la angiosperma marina *Zostera noltei*.
5. El aumento de la frecuencia de alimentación en el cultivo de la dorada puede atenuar los efectos perjudiciales producidos por el impacto de la actividad acuícola sobre las comunidades de praderas de angiospermas marinas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- APROMAR. (2018). La Acuicultura en España. *Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente*, 93. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Audouin, J. (1962). La daurade de l'étang de Thau *Chrysophrys aurata* (Linné). *Revue Des Travaux de l'Institut Des Peches Maritimes*, 26(1), 105–126
- Blázquez Martínez, J. M. (2006). La pesca en la antigüedad y sus factores económicos. Historia de La Pesca En El Ámbito Del Estrecho. *I Conferencia Internacional.*, 17–36
- Borja, Á. (2002). Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 18(1–4), 41–49
- Boudouresque, C. F., Bernard, G., Pergent, G., Shili, A., & Verlaque, M. (2009). Regression of Mediterranean seagrasses caused by natural processes and anthropogenic disturbances and stress: A critical review. *Botanica Marina*, 52(5), 395–418. doi: 10.1515/BOT.2009.057
- Brun, F. G., Hernández, I., Vergara, J. J., Peralta, G., & Pérez-Lloréns, J. L. (2002). Assessing the toxicity of ammonium pulses to the survival and growth of *Zostera noltii*. *Marine Ecology Progress Series*, 225, 177–187. doi: 10.3354/meps225177
- Brun, F. G., Olivé, I., Malta, E. J., Vergara, J. J., Hernández, I., & Pérez-Lloréns, J. L. (2008). Increased vulnerability of *Zostera noltii* to stress caused by low light and elevated ammonium levels under phosphate deficiency. *Marine Ecology Progress Series*, 365, 67–75. doi: 10.3354/meps07512
- Brun, F. G., Perez-Llorens, J. L., Hernandez, I., & Vergara, J. J. (2003a). Patch Distribution and Within-Patch Dynamics of the Seagrass *Zostera noltii* Hornem. in Los Torunos Salt-Marsh, Cadiz Bay, Natural Park, Spain. *Botanica Marina*, 46(6), 513–524. doi: 10.1515/BOT.2003.053
- Brun, F. G., Pérez-Pastor, A., Hernández, I., Vergara, J. J., & Pérez-Lloréns, J. L. (2006). Shoot organization in the seagrass *zostera noltii*: Implications for space occupation and plant architecture. *Helgoland Marine Research*, 60(1), 59–69. doi: 10.1007/s10152-005-0017-0

- Brun F. G., Vergara J. J., Hernández I., & Pérez-Lloréns J. L. (2003). Growth, carbon allocation and proteolytic activity in the seagrass *Zostera noltii* shaded by *Ulva* canopies. *Funct. Plant. Biol.*, 30: 551-560. doi: 10.1071/FP03010
- Brun, F. G., Vergara, J. J., Navarro, G., Hernández, I., & Pérez-lloréns, J. L. (2003b). Effect of shading by *Ulva rigida* canopies on growth and carbon balance of the seagrass *Zostera noltii*, 265, 85–96
- Burkholder, J. M., Tomasko, D. A., & Touchette, B. W. (2007). Seagrasses and eutrophication. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350(1–2), 46–72. doi: 10.1016/j.jembe.2007.06.024
- Cabaço S. & Santos R. (2007). Effects of burial and erosion on the seagrass *Journal of Experimental Mar. Biol.*, 340: 204-212. doi: 10.1016/j.jembe.2006.09.003
- Calleja, M. L., Marbà, N., & Duarte, C. M. (2007). The relationship between seagrass (*Posidonia oceanica*) decline and sulfide porewater concentration in carbonate sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73(3–4), 583–588. doi: 10.1016/j.ecss.2007.02.016
- Campbell, A.C. (1979). *Guía de campo de la flora y fauna de las costas de España y de Europa*. Ediciones Omega, Barcelona. 336 pp. ISBN/ISSN: 84-282-0543-4
- Castejón-Silvo I., Terrados J., Domínguez M., & Morales-Nin B. (2012) Epiphyte response to in situ manipulation of nutrient availability and fish presence in a *Posidonia oceanica* (L.) Delile meadow. *Hydrobiologia* 696:159–170. doi: 10.1007/s10750-012-1190-1
- Christianen, M. J. A., van Belzen, J., Herman, P. M. J., van Katwijk, M. M., Lamers, L. P. M., van Leent, P. J. M., & Bouma, T. J. (2013). Low-Canopy Seagrass Beds Still Provide Important Coastal Protection Services. *PLoS ONE*, 8(5). doi: 10.1371/journal.pone.0062413
- Costanza, R., D'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R. V., Paruelo, J., Raskin, R. G., Sutton, P., & van den Belt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387(6630), 253–260. doi: 10.1038/387253a0

- Duarte, C. M., Dennison, W. C., Orth, R. J. W., & Carruthers, T. J. B. (2008). The charisma of coastal ecosystems: Addressing the imbalance. *Estuaries and Coasts*, 31(2), 233–238. doi: 10.1007/s12237-008-9038-7
- Egea, L. G., Jiménez-Ramos, R., Vergara, J. J., Hernández, I., & Brun, F. G. (2018). Interactive effect of temperature, acidification and ammonium enrichment on the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Marine Pollution Bulletin*, 134, 14-26. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.02.029
- Egea, L. G. (2012). *Efectos a corto plazo del incremento en co2 y disminución de la irradiancia en Zostera noltii hornem.: respuesta en mesocosmos*. (Tesis de Máster). Universidad de Cádiz, Puerto Real.
- Egea, L. G. (2017). *Carbon metabolism and dissolved organic carbon (DOC) fluxes on seagrass communities: insights from plant colonization states, eutrophication and global change related factors* (Tesis Doctoral). Universidad de Cádiz, Puerto Real.
- Enes, P., García-Meilán, I., Guerreiro, I., Couto, A., Pousão-Ferreira, P., Gallardo, M. A., & Oliva-Teles, A. (2015). Utilization of dietary starch by juvenile white sea bream *Diplodus sargus* at different feeding frequencies. *Aquaculture Nutrition* doi: 10.1111/anu.12227
- FAO. (2014). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Oportunidades y desafíos*. Roma doi: 978-92-5-308275-9 ISSN1020-5500
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Fourqurean, J. W., Duarte, C. M., Kennedy, H., Marbà, N., Holmer, M., et al. (2012). Seagrass ecosystems as a globally significant carbon stock. *Nature Geoscience*, 5(7), 505–509. doi: 10.1038/ngeo1477
- Gattuso, J.-P., Frankignoulle, M., & Wollast, R. (1998). Carbon and Carbonate Metabolism in Coastal Aquatic Ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 405–434. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.29.1.405
- González-Ortíz, V. (2009). *Las fanerógamas marinas como islas de diversidad en el sistema litoral: un caso de estudio en el parque natural Bahía de Cádiz*. (Tesis de Máster). Univesidad de Cádiz, Puerto Real

Heinzpeter, S. B. (2018). *Sparus aurata* (Summary). In: FishEthoBase, ed. Fish Ethology and Welfare Group. World Wide Web electronic publication. Version 1.2. www.fishethobase.net.

Hemminga, M.A., & Duarte, C. M. (2000). *Seagrass Ecology*. Cambridge: University Press, UK, 298 pp.

Hernández, I., Morris, E., Vergara, J.J., de los Santos, C., González-Ortíz, V., Villazán, B., Peralta, G., Olivé, I., Brun, F.G., García-Marín, P., Lara, M. & Pérez-Lloréns, J.L. (2010): Praderas de fanerógamas marinas en la bahía de Cádiz: conservación y gestión. *Congreso de medioambiente CONAMA10*.

Holmer, M., & Bondgaard, E. J. (2001). Photosynthetic and growth response of eelgrass to low oxygen and high sulfide concentrations during hypoxic events. *Aquatic Botany*, 70(1), 29–38. doi: 10.1016/S0304-3770(00)00142-X

Invers, O., Kraemer, G. P., Pérez, M., & Romero, J. (2004). Effects of nitrogen addition on nitrogen metabolism and carbon reserves in the temperate seagrass *Posidonia oceanica*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 303(1), 97–114. doi: 10.1016/j.jembe.2003.11.005

Ivanova, A., Micheline, M., Olvera, C., Monteforte-sánchez, M., Ramírez, E. A., Domínguez, W., et al. (2017). La economía azul como modelo de sustentabilidad para estados costeros: el caso de Baja California Sur. *Sociedad y Ambiente*, 14, 75-98, ISSN 2007-6576

Jiménez-Ramos, R., Egea, L. G., Vergara, J. J., & Brun, F. G. (2018) Nutrient load and epiphytes are drivers of increased herbivory in seagrass communities. *Marine Ecology Progress Series*, 599: 49-64. doi: 10.3354/meps12622

Jiménez-Ramos, R., Mancilla, M., Villazán, B., Egea, L. G., González-Ortiz, V., Vergara, J. J., Pérez-Lloréns, J. L., & Brun, F. G. (2017) Resistance to nutrient enrichment varies among components in the *Cymodocea nodosa* community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 497: 41–49. doi: 10.1016/j.jembe.2017.09.008

- Jobling, M. (1981). The influences of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review. *Journal of Fish Biology*, 18(4), 385–400. doi:10.1111/j.1095-8649.1981.tb03780.x
- Koutsoubas, D., Arvanitidis, C., Dounas, C., & Drummond, L. (2000). Community structure and dynamics of the Molluscan Fauna in a Mediterranean lagoon (Gialova lagoon, SW Greece). *Belg. J. Zool.* 130 (Supplement 1):131-138
- Mancera, J. M. (2004). El Sistema de Estrés en Peces Teleósteos. Proceedings of Osmorregulación en Peces Teleósteos. Valdivia, August 9 to 20, 2004
- Marschner, H. (1995) *The mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London, 645 pp.
- Mendoza, L. H. (2004). *Conociendo la naturaleza: Ecosistemas Costero-marinos*, Vol. 3. Programa Ambiental para Centroamérica, componente de Áreas Protegidas y Mercadeo Ambiental. Manual básico para el guardarecurso Centroamericano, 63 pp.
- Messina, M., Sánchez-Gurmaches, J., Navarro, I., Gutierrez, J., Bertotto, D., Tibaldi, E., Tulli, F. (2014). Feeding Frequency Differently Affects Post Prandial Patterns of Plasma Glucose, Insulin and Insulin-like Growth Factor I in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 14, 921-928. doi: 10.4194/1303-2712-v14_4_11
- Millán-Cubillo, A. F., Martos-Sitcha, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Cárdenas, S., & Mancera, J. M. (2016). Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). *Aquaculture*, 451, 87–92. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.08.034
- Montoya, A., López-Olmeda, J. F., Yúfera, M., Sánchez-Muros, M. J., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 306(1–4), 315–321. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.06.023
- Moreno-Marín, F., Vergara, J. J., Pérez-Llorens, J. L., Pedersen, M. F., & Brun, F. G. (2016). Interaction between ammonium toxicity and green tide development over seagrass meadows: A laboratory study. *PLoS ONE*, 11(4). doi: 10.1371/journal.pone.0152971

- Naciones Unidas, (2017). Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población. World Population Prospects: La revisión de 2017, datos personalizados adquiridos a través del sitio web.
- Nixon, S. W. (1995). Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, 41(1), 199–219. doi: 10.1080/00785236.1995.10422044
- Olivé I., Brun F. G., Vergara J. J., & Pérez-Lloréns J. L. (2007). Effects of light and biomass partitioning on growth, photosynthesis and carbohydrate content of the seagrass *Zostera noltii* Hornem. *Mar. Biol.*, 345: 90-100. doi: 10.1016/j.jembe.2007.02.008
- Ortega, A. (2008). *Cultivo de Dorada (Sparus aurata)*. Cuadernos de Acuicultura, 45 pp.
- Peralta G., Pérez-Llorens J. L., Hernández I., Brun F., Vergara J. J., Bartual A., Gálvez, J. A., & García C. M. (2000). Morphological and physiological differences of two morphotypes of *Zostera noltii* Hornem. from the south-western Iberian Peninsula. *Helgol. Mar. Res.*, 54: 80-86. doi: 10.1007/s101520050005
- Peralta G., Pérez-Lloréns J. L., Hernández I., & Vergara J. J. (2002) Effects of light availability on growth, architecture and nutrient content of the seagrass *Zostera noltii* Hornem. *J Exp Mar Bio Ecol* 269:9–26. doi: 10.1016/S0022-0981(01)00393-8
- Reig, A. C. (2001). *Efectos de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento y consumo de oxígeno de la dorada (Sparus aurata L.) Vol I*. Departament de Biologia Animal, 64 pp.
- Riedl, R. (1986). *Fauna y flora del mar Mediterráneo: una guía sistemática para biólogos y naturalistas*. Ediciones Omega, Barcelona. 858 pp. ISBN/ISSN: 84-282-0767-4.
- Ruiz, J.M., Guillén, J.E., Ramos Segura, A. & Otero, M. M. (2015). *Atlas de las praderas marinas de España*. IEO/IEL/UICN, Murcia-Alicante-Málaga, 681 pp.
- Ruiz, J. M., & Romero, J. (2001). Effects of in situ experimental shading on the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology Progress Series*, 215, 107–120. doi: 10.3354/meps215107

- Ruiz, J. M., & Romero, J. (2003). Effects of disturbances caused by coastal constructions on spatial structure, growth dynamics and photosynthesis of the seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Pollution Bulletin*, 46(12), 1523–1533. doi: 10.1016/j.marpolbul.2003.08.021
- Ruiz Mata, D., Ruiz Gil, J. A., & López Amador, J. J. (2006). La pesca en época prerromana en la Bahía de Cádiz. (Apendice sobre las factorías de salazones en el Puerto de Santa María). *Historia de La Pesca En El Ámbito Del Estrecho. I Conferencia Internacional.*, 269–337
- Salama, A. J. (2008). Effects of different feeding frequency on the growth, survival and feed conversion ratio of the Asian sea bass *Lates calcarifer* juveniles reared under hypersaline seawater of the Red Sea. *Aquaculture Research*, 39(6), 561–567. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01890.x
- Short, F. T., Polidoro, B., Livingstone, S. R., Carpenter, K. E., Bandeira, S., Bujang, J. S., et al. (2011). Extinction risk assessment of the world's seagrass species. *Biological Conservation*, 144(7), 1961–1971. doi: 10.1016/j.biocon.2011.04.010
- Sun, G., Liu, Y., Qiu, D., Yi, M., Li, X., & Li, Y. (2016). Effects of feeding rate and frequency on growth performance, digestion and nutrients balances of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquaculture Research*, 47(1), 176–188. doi: 10.1111/are.12480
- Unsworth, R. K. F., Nordlund, L. M., & Cullen-Unsworth, L. C. (2018). Seagrass meadows support global fisheries production. *Conservation Letters*, (April), 1–8. doi: 10.1111/conl.12566
- Van Katwijk, M. M., Vergeer, L. H. T., Schmitz, G. H. W., & Roelofs, J. G. M. (1997). Ammonium toxicity in eelgrass *Zostera marina*. *Marine Ecology Progress Series*, 157, 159–173. doi: 10.3354/meps157159
- Vera, L.M., Negrini, P., Zagatti, C., Frigato, E., Sánchez-Vázquez, F.J., & Bertolucci, C. (2013). Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiol. Int.* 30, 649–661 doi: 10.3109/07420528.2013.775143

- Verdiell-Cubedo, D., Oliva-Paterna, F. J., & Torralva-Forero, M. (2007). Fish assemblages associated with *Cymodocea nodosa* and *Caulerpa prolifera* meadows in the shallow areas of the Mar Menor coastal lagoon. *Limnetica*, 26(2), 341–350. ISSN 0213-8409
- Vergara, J. J., García-Sánchez, M. P., Olivé, I., García-Marín, P., Brun, F. G., Pérez-Lloréns, J. L., & Hernández, I. (2012). Seasonal functioning and dynamics of *Caulerpa prolifera* meadows in shallow areas: An integrated approach in Cadiz Bay Natural Park. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 112, 255–264. doi: 10.1016/j.ecss.2012.07.031
- Vergara, J. M. (2000). Consideraciones socio-economicas sobre el momento actual de la acuicultura marina en España. *AquaTic*, 10, 1–11.
- Vergara Martín, J. M., Haroun Tabraue, R. J., & González Henríquez, M. N. (2005). *Evaluación de Impacto Ambiental de Acuicultura en Jaulas en Canarias*. Oceanográfica, Teide. ISBN:84- 609-4073-X. 110 pp.
- Waycott, M., Duarte, C. M., Carruthers, T. J. B., Orth, R. J., Dennison, W. C., Olyarnik, S. et al. (2009). Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), 12377–12381. doi: 10.1073/pnas.0905620106
- Yúfera, M., Romero, M. J., Pujante, I. M., Astola, A., Mancera, J. M., Sánchez-Vázquez, F. J., Moyano, F. J., & Martínez-Rodríguez, G. (2014). Effect of feeding frequency on the daily rhythms of acidic digestion in a teleost fish (gilthead seabream). *Chronobiology International*, 31(9), 1024–1033. doi: 10.3109/07420528.2014.944265
- Yúfera, M., Moyano, F.J., & Martínez-Rodríguez, G. (2018b). The digestive function in developing fish larvae and fry. From molecular gene expression to enzymatic activity. In: Yúfera, M. (Ed.), *Emerging Issues in Fish Larvae Research*. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, pp 51–86.
- Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S., Tandler, A., Bromage, N. R., & Roberts, R. J. (1995). Gilt-head seabream (*Sparus aurata*), 94–117.